

Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Zur Charakterisierung und Wertbestimmung der
Früchte von *Serenoa repens* (Bartr.) Small und
der daraus hergestellten Arzneimittel

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
GISELA SCHÖPFLIN
aus Berlin

1967

Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Zur Charakterisierung und Wertbestimmung der
Früchte von *Serenoa repens* (Bartr.) Small und
der daraus hergestellten Arzneimittel

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
GISELA SCHÖPFLIN
aus Berlin



1. Referent: Prof. Dr. R. Hänsel

2. Referent: Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung: 14.2.1967

Tag der Promotion:

13. Juli 1967

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, München 22, Bruderstraße 9

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Hänsel durchgeführt.

Es sei mir gestattet, meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. R. Hänsel, an dieser Stelle für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit, das große Interesse, das er ihr entgegenbrachte, sowie für wertvolle Ratschläge und seine stete wissenschaftliche Förderung herzlich zu danken.

Herrn Dr. H. Rimpler, wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin, bin ich für die zahlreichen klärenden Gespräche und Hinweise im Zusammenhang mit meiner Arbeit zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Herzlich danken möchte ich auch:

der Firma Schering, besonders den Herren Dipl.-Ing. J. Huber, Dr. W. Neudert und Dr. G. Schulz für die Ausführung von Mikroanalysen und die Aufnahme von Spektren,

Frau Dr. Potztal, Kustos am Botanischen Museum Berlin-Dahlem, für die Diskussion botanischer Probleme, die die Arbeit berühren,

meinen Mitarbeitern am Institut für Pharmakognosie, die sich stets in liebenswürdiger Weise um die Erfüllung meiner Bitten und Wünsche bemühten.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I) Einleitung und Problemstellung.....	10
II) Botanische Beschreibung der <i>Serenoa repens</i> (Bartr.) Small.....	12
III) Literaturübersicht	
A) Bisherige Kenntnisse über die Inhaltsstoffe der Früchte von <i>Serenoa repens</i> (Bartr.) Small.....	17
B) Pflanzenstoffe mit hormonartiger Wirkung, insbesondere Oestrogene aus Pflanzen.....	19
C) Zur Biosynthese der pflanzlichen Sterine.....	25
D) Pflanzliche Sterine und Steringlykoside und ihre Charakterisierung.....	44
IV) Eigene Untersuchungen	
H a u p t t e i l	
A) Orientierende Voruntersuchungen an Extrakten aus den getrockneten Früchten.	53
1) Extraktionsschema: Extrakte aus den Früchten von <i>Serenoa repens</i> zu Voruntersuchungen.....	54
2) Dünnschichtchromatographische Prüfung auf Flavonoide.....	55
3) Prüfung auf Leucoanthocyane.....	57
4) Prüfung auf Anthranilsäure.....	59
a) Nachweis der Anthranilsäure.....	59
b) Mikropraeparative Isolierung der Anthranilsäure.....	60
α) aus der Urbinktur - β) aus dem Methanolextrakt	
5) Prüfung auf Sterine.....	62
a) Adsorptionschromatographie eines Petrolaetherextraktes an Kieselgel.....	62
b) Chromatographie eines Methanol-extraktes an Aluminiumoxyd und Kieselgel.....	62
B) Untersuchung der unverseifbaren Anteile von Drogenextrakten auf Steroide.....	64
1) Extraktion des Drogenmaterials und Gewinnung der unverseifbaren Anteile.	64
2) Auftrennung der unverseifbaren Anteile.....	65

2,1)	Petrolaetherextrakt	
a)	Dünnschichtchromatographische Prüfung	65
b)	Isolierung der Verbindungen α_1 und Pe_1	65
c)	Identifizierung der Verbindung α_1 als β -Sitosterin	66
2,2)	Methylenchloridextrakt	
a)	Dünnschichtchromatographische Prüfung	68
b)	Versuche zur Isolierung definierter Substanzen und Anreicherung von β_2	68
c)	Versuch zur Isolierung von β_2 durch multiplikative Verteilung	69
2,3)	Methanolextrakt	
a)	Dünnschichtchromatographische Prüfung	70
b)	Versuche zur Isolierung definierter Verbindungen.....	70
	α) durch Säulenchromatographie an Kieselgel - β) durch multiplikative Verteilung	
c)	Isolierung von β_4 und Identifizierung als β -Sitosterin-D-glukosid	72
2,4)	Urtinktur	
a)	Digitoninfällung	75
b)	Multiplikative Verteilung des Zentrifugates der Digitoninfällung	75
3)	Quantitative Bestimmung des Sitosterins in den Früchten von Serenoa repens	76
a)	Bestimmung des nicht glykosidisch gebundenen Sitosterins	76
b)	Bestimmung des Sitosteringlykosides	76
4)	Quantitative Bestimmung des Sitosterins in der Urtinktur	77
a)	Bestimmung des nicht glykosidisch gebundenen Sitosterins	77
b)	Bestimmung des Sitosteringlykosides	77
C)	Zusammenfassung	78
D)	Diskussion	79

Experimenteller Teil

A)	Allgemeines.....	81
B)	Voruntersuchungen an Extrakten aus der Droge	
1)	Prüfung auf Flavonoide	83
a)	Dünnschichtchromatographie an Polyamid/Cellulose	83
b)	Mikropraeparative Isolierung der Verbindung F ₃	84
2)	Vorproben zum Nachweis eines Leucoanthocyans.....	84
3)	Prüfung von Alkoholextrakten auf Anthranilsäure und mikropraeparative Isolierung	
a)	Chromatographischer Nachweis.....	85
b)	Mikropraeparative Isolierung.....	87
	α) aus der Urtinktur - β) aus dem Methanolextrakt	
4)	Voruntersuchungen zum Nachweis von Sterinen	
a)	Fraktionieren eines Petrolaether-extraktes	91
b)	Säulenchromatographie eines Methanolextraktes	93
	α) Vortrennung an Aluminiumoxyd-β) Säulenchromatographie des Eluates der ersten Zone	
C)	Auftrennung des unverseifbaren Anteiles aus dem Petrolaetherextrakt.....	94
1)	Isolierung des Unverseifbaren	94
2)	Dünnschichtchromatographie des Unverseifbaren.....	95
3)	Säulenchromatographie des Unverseifbaren.....	95
a)	Grobfraktionieren an Kieselgel...	95
b)	Isolierung der Verbindung Pe ₁	98
c)	Isolierung der Verbindung α ₁	98
d)	Charakterisierung der Verbindung α ₁ durch analytische Methoden ...	99
D)	Auftrennung der unverseifbaren Anteiles aus dem Methylenchloridextrakt.....	101
1)	Isolierung des Unverseifbaren.....	101
2)	Dünnschichtchromatographie des Unverseifbaren	102
3)	Säulenchromatographie des Unverseifbaren.....	103

a)	Säulenchromatographische Grob- trennung.....	103
b)	Säulenchromatographie β_2 -ange- reicherter Fraktionen.....	105
c)	Versuche zur Isolierung von β_2 aus angereicherten Fraktionen mittels multiplikativer Ver- teilung.....	109
4)	Multiplikative Verteilung des Unverseifbaren.....	109
5)	Praeparative Papierchromatographie β_2 -angereicherter Fraktionen.....	110
E)	Auftrennung des unverseifbaren Anteiles aus dem Methanolextrakt.....	112
1)	Isolierung des Unverseifbaren.....	112
2)	Dünnschichtchromatographie des Unverseifbaren.....	113
3)	Säulenchromatographie des Unverseifbaren.....	114
a)	Grobfraktionieren an Kieselgel..	114
b)	Versuch zur Isolierung von γ_6 ...	116
c)	Versuch zur Isolierung von γ_8 ...	117
4)	Multiplikative Verteilung des Unverseifbaren.....	117
a)	Erste multiplikative Verteilung.	117
b)	Multiplikative Verteilung eines Gemisches mit den Verbindungen γ_8 und β_4	119
5)	Isolierung der Verbindung β_4	121
a)	Multiplikative Verteilung des Unverseifbaren und β_4 -ange- reicherter Fraktionen.....	121
b)	Charakterisierung von β_4 durch analytische Methoden.....	122
	α) Löslichkeit- β) Schmelzpunkt- γ) Elementaranalyse- δ) IR-Ab- sorptionsspektrum- ϵ) Acetylierung ζ) Säurehydrolytische Spaltung von β_4 - ξ) Chromatographischer Nachweis des Zuckers- η) Charakte- risierung des Aglykons	
F)	Analytische und mikropraeparative Auf- trennung des unverseifbaren Anteiles aus der Urtinktur.....	125
a)	Digitoninfällung.....	125
b)	Auftrennung des Filtrates der Digitoninfällung.....	127

G)	Quantitative Bestimmung von Sitosterin in den Früchten von <i>Serenoa repens</i>	128
	a) Bestimmung des nicht glykosidisch gebundenen Sitosterins.....	128
	b) Bestimmung des Gesamtsitosterins....	129
H)	Quantitative Bestimmung von Sitosterin in der Urtinktur	130
	a) Bestimmung des nicht glykosidisch gebundenen Sitosterins	130
	b) Bestimmung des Gesamtsitosterins....	131
VI)	Literaturverzeichnis.....	132
VI)	Lebenslauf.....	142

I. Einleitung und Problemstellung

Alkoholauszüge aus den frischen oder getrockneten Beerenfrüchten der Sägepalme *Serenoa repens* (Bartr.) Small werden seit langem als Phytotherapeutica bei bestimmten leichteren Formen der Prostatahypertrophie und bei beginnender Prostatitis verwendet (1;2). Darüberhinaus sagt man der Droge eine aphrodisierende und zu Fettansatz führende Wirkung nach. Der im Sinne der üblichen therapeutischen Verwendung von Alkoholextrakten aus den Serenoafrüchten pharmakologisch wirksame Bestandteil ist bisher unbekannt. Vermutungen wurden geäußert, nach denen das aetherische Oel der Wirkungs-träger sei (3). Ein echtes aetherisches Oel ist in den Früchten jedoch nicht nachzuweisen. Andere Autoren vermuten aufgrund pharmakologischer Effekte hormonartige Wirkstoffe in den Serenoafrüchten (2;4). Diese Wirkungen sind nicht in exakten pharmakologischen und klinischen Versuchen gesichert. Da jedoch eine empirische Verwendung als Arzneimittel auch heute noch üblich ist, schien eine eingehende Prüfung der Inhaltsstoffe gerechtfertigt.

Die vorliegende Untersuchung soll einen Beitrag zu der noch offenen Frage nach dem Wirkstoff leisten. Wir wollten versuchen die Verbindungen zu isolieren, denen die therapeutischen Wirkungen der Ganzdrogenzubereitungen zuzuordnen sind. Grundsätzlich gibt es drei verschiedene Möglichkeiten solche Wirkstoffuntersuchungen durchzuführen:

- 1) Die von einem biologischen Test geführte systematische Auftrennung der Drogenauszüge
- 2) Eine Wirkstoffuntersuchung ohne pharmakologische Führung, wobei die Drogenauszüge nach chemischen oder physikalisch-chemischen Methoden fraktioniert werden, in der Hoffnung, Wirkstoffe dadurch zu finden, daß man auf nicht ubiquitäre und solche Stoffe achtet, die in erheblichen Mengen auftreten. Die isolierten Verbindungen

werden dann pharmakologisch getestet.

3) Der dritte mögliche Weg einer Wirkstoffuntersuchung geht von einer Arbeitshypothese aus, die von engeren Prämissen herkommt und die auf analogischem Denken beruht. Der pharmakologische Versuch mit den isolierten Verbindungen dient in diesem Falle nur zur Prüfung der Gültigkeit der Arbeitshypothese.

Der erste der drei Wege schied aus, weil kein schnell durchzuführender pharmakologischer Test zur Verfügung stand. Die nach einer weiter gefassten Arbeitshypothese anzustellende Fraktionierung der Drogenauszüge nach chemischen oder physikalisch-chemischen Methoden erwies sich in zahlreichen Voruntersuchungen als nicht gangbar, da ein sinnvolles Fraktionieren äußerst diffizil wird, kristalline Stoffe ohne weiteres schon garnicht anfallen und selbst adsorptionschromatographisch weitgehend aufgetrennte Fraktionen höchst selten Kristallisationstendenz zeigen.

Es wurde daher eine Wirkstoffuntersuchung nach einer eingeschränkten Arbeitshypothese nach Punkt 3) vorgenommen: wir gingen der von SCHINDLER geäußerten Vermutung nach, daß es sich bei den Wirkstoffen um Verbindungen mit hormonartiger Wirkung handelt und achteten dabei besonders auf möglicherweise oestrogen wirksame Stoffe, da in der Schulmedizin insbesondere Oestrogene zur Behandlung bestimmter Prostataerkrankungen herangezogen werden. Bisher können im wesentlichen Substanzen aus drei im Pflanzenreich vorkommenden Stoffklassen oestrogen wirken, nämlich Steroide, Stilbene und Isoflavone. Während auf das Vorkommen der letzteren orientierend geprüft wurde, lag der eigentliche Schwerpunkt der Untersuchungen in der Charakterisierung der Steroidfraktion von Extrakten aus den Serenoafrüchten.

II. Botanische Beschreibung der *Serenoa repens* (Bartr.) Small

Zu der Tribus Corypheeae in der Unterfamilie der Coryphoideae, die der Familie der Palmae zugeordnet wird (11), gehört die monotypische Gattung *Serenoa* J.D. Hooker (in Bent. & Hook, Gen. Pl. iii, 1228 (1883)) mit *Serenoa repens* (Bartr.) Small (in Journ. N.Y. Bot. Gard. XXVII, 197, 1926) (5; 102). Diese auch Saw Palmetto genannte Palme wird mit den Arten der Gattung *Sabal* zu den "Palmettos" zusammengefaßt, unterscheidet sich jedoch von den *Sabal*arten in der Ausbildung der Petiolen, die bei *Serenoa* in der Regel einen gesägten Rand tragen (7,10). Die Abtrennung der Gattung *Serenoa* von der Gattung *Sabal* geht auf J.D. Hooker (1883) zurück. Der Gattungsname *Serenoa* wurde nach dem Vornamen des amerikanischen Botanikers Sereno Watson (1826-1892) gewählt (9). Folgende weiteren Synonyma sind für die in den küstennahen Kiefernwäldern der immergrünen Region der südatlantischen Staaten Nordamerikas, vor allem in Süd-Carolina und Florida, auf sandigem Dünenboden wachsende *Serenoa repens* (Bartr.) Small gebräuchlich:

Corypha repens Wm. Bartram, Travels, 61 (1791)

Corypha obliqua Wm. Bartram, Travels, 61 (1791)

Chamaerops serrulata, Michx. Fl. Bor. - Amer. i,
239 (1803)

Brahea serrulata, Wendl. in Kerchove, Palmiers, 235
(1878)

Sabal serrulata, Schultes & Schultes, Syst. Veg. vii,
1486 (1830)

Serenoa serrulata, Nichols. Ill. Dict. Gard. iii, 423
(1887)

Serenoa serrulata (Michx.) Hook. fil.

Serenoa repens (Bartr.) Small ist eine Buschpalme, die ohne Stamm oder kurzstämmig, dann 1 bis 3 m aus dem Erdreich aufragend, wächst und ausgedehnte Kolonien bildet. Die regelmäßig gut ausgebildeten Rhizome wachsen horizon-

tal kriechend, in sumpfigen Gegenden sind sie oft reich verzweigt. Zuweilen wächst der Stamm 6 bis 7 m lang schräg aufgerichtet. Dann ist die Pflanze baumartig und hat einen schlanken, rauhen Stamm. Die Stämme tragen in einem endständigen Schopf fächerförmige Blätter ohne ausgeprägte Hastula*, denen durchgehende Mittelnerven fehlen. Die grünen, gelbgrünen oder grau-

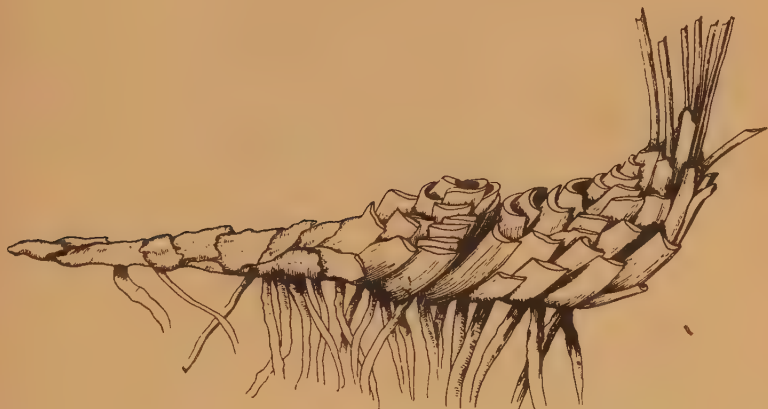


Abbildung 1: Rhizom von *Serenoa repens* (Bartr.)
Small (7a)

grünen Palmwedel haben in der Fläche einen Durchmesser von etwa 1m. Die Fächersegmente sind 25 bis 35 cm lang, die Blattstiele in der Regel schlank und zur braungefärbten Basis hin verbreitert, oft viel länger als die Fächer. Sie sind an ihrer Unterseite konvex und haben eine nahezu ebene Oberseite, einen dicht gesägten Rand, obwohl in einigen seltenen Fällen die Zähne fast ganz fehlen können. Die Oberfläche des Stammes ist bedeckt von der Basis der Blätter, die von einem braunen Membranflecht überzogen sind. Auf jeder Seite der beiden

* zum Begriff Hastula: siehe L.H. Bailey, Gent. Herb. iii, 16 (1933)

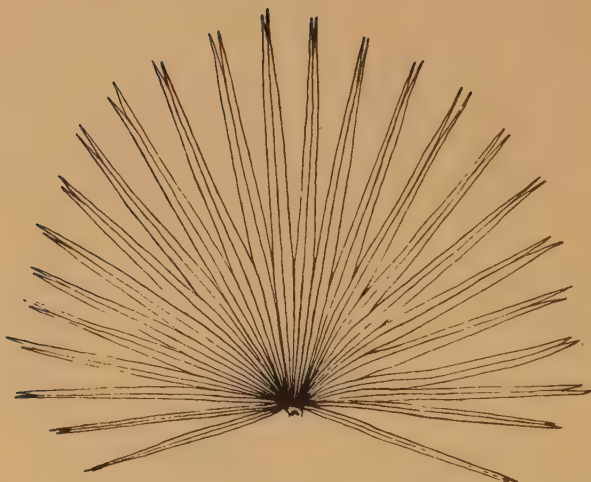


Abbildung 2: Fächer des Palmwedels von *Serenoa repens* (Bartr.) Small (7b)

Fächerhälften zählt man 9 bis 12 Fächersegmente, fest und steif, mitunter auch locker hängend. Am Segment zeichnet sich der Hauptnerv deutlich ab und oft gibt es daneben einen deutlichen sekundären Nerv auf beiden Seiten und mehrere tertiäre Nerven. Die Blütenstände sind in der Regel kürzer als die Blätter, meistens einfach verzweigt und vielblütig. Die Blüten sind fest sitzend, 5 bis 6 mm lang. Zwei Wirtel bilden das dreizählige Perianth. Der Kelch ist kurz röhrenförmig und gezähnt. Die Kronblätter sind länger als der Kelch, sie biegen sich während der Anthese stark nach außen. Die Filamente der sechs Staubblätter sind breit, die Antheren ragen aus der Blüte hervor. Der oberständige Fruchtknoten wird aus drei Fruchtblättern gebildet. Die Früchte sind im Unterschied zu denen der Sabalarten ovale schuppenlose Beeren mit endständigen Griffelresten (6), dicht sitzend und unterschiedlich in Form und Größe: entweder



Abbildung 3: Teil eines Blattstieles, Blütenstand, Einzelblüte, Fruchtknoten, Staubblatt und Kronblatt (v.l.n.r.) von *Serenoa repens* (Bartr.) Small (7c)

elliptisch gestreckt oder mehr oder weniger birnenförmig. Sie haben einen Durchmesser von 20 bis 25 mm, sind schwarz oder bläulich, glatt, kurzgestielt und leicht von Tieren zu verschleppen. Das Pericarp besteht aus einem schwarzbraunen Epicarp, einem gelbgrünen oelführenden Mesocarp und einem gelb gefärbten häutigen Endocarp. Im getrockneten Zustand sind die Früchte regelmäßig netzrunzlig.

Kleine dünnwandige Zellen bilden die Fruchtwandepi-

dermis. Das Fruchtfleisch besteht aus großzelligem dünnwandigem Parenchym mit großlumigen getüpfelten Steinzellen; Gefäßbündel werden von Fasern mit anliegenden Deckzellen begleitet. Die innerste Schicht des Pericarps bilden stark verdickte, reichlich getüpfelte und unregelmäßig geformte Steinzellen (8). Die braunen Samen sind von einer hornartigen Schale umschlossen, elliptisch gestreckt bis zylinderförmig, zu den Enden hin verjüngt, etwa 18 mm lang und etwa halb so breit.

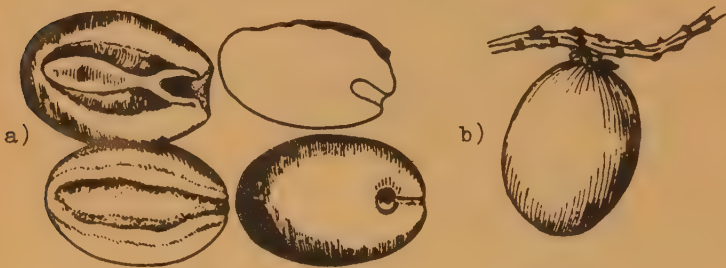


Abbildung 4: Samen (a) und Frucht (b) von *Serenoa repens* (Bartr.) Small (7d)

Sie sind an der Oberfläche glatt und stumpf, mit einer über die Längsseite auffallend ausgedehnten Raphennaht und einer kreisförmig versenkten Mikropyle, wie bei der Gattung *Sabal* dorsal gelegen und einem Ende des Samens genähert. Die Samenschalenepidermis ist großzellig, die Zellen sind derbwandig, die inneren Zellschichten der Samenschale sind dünnwandig, die Zellen kleiner und die innersten Schichten sind kleinzellig und flach. Das Endosperm wird von derbwandigen Zellen gebildet, die im Innern des Samens grob getüpfelt sind. Die Mittellamelle ist deutlich zu erkennen. Das Endosperm ist in getrocknetem Zustand hornartig, weiß und besitzt ein starkes Quellungsvermögen.

III. Literaturübersicht

A) Bisherige Kenntnisse über die Inhaltsstoffe der Früchte von *Serenoa repens* (Bartr.) Small

Als Arzneimittel werden die frischen und getrockneten Beeren oder Alkoholextrakte aus den Beerenfrüchten der im tropischen Süd- und Mittelamerika und in den Südstaaten Nordamerikas beheimateten Stampfpflanze gebraucht. Im englischen Sprachgebrauch werden diese Früchte als Saw Palmetto Berries bezeichnet, im spanischen die getrockneten Früchte als Bayas negros (22;24). Das Gewicht der Droge verteilt sich etwa folgendermaßen: 36% Epicarp, 16% Mesocarp, 10% Endocarp und 38% Samen (21). GRIEBEL und BARNES (13) geben für eine Durchschnittsprobe des Fruchtfleisches der getrockneten Früchte folgendes an: 15,4% Wasser, 26,7% Rohfett, 28,2% Invertzucker, 3,74% Asche. Der Rest verteilt sich auf sonstige Extraktstoffe, von denen vor allem Mannit zu erwähnen ist. Die Früchte enthalten reichlich fettes Oel, nach KRAEMER (12) sind es 4 bis 5% bezogen auf das Gewicht der frischen Beeren. SCHINDLER fand in einem Drogenmuster bis zu 35% fettes Oel (2). Das Oel des Pericarps ist im Gegensatz zu dem des Pericarps der Früchte von *Elaeis guineensis* dem des Endocarps in seiner Zusammensetzung sehr ähnlich. Das durch geringe Mengen eines Carotins (nach SCHINDLER gibt es mit Schwefelsäure eine blaue Farbreaktion) orangerot gefärbte Rohfett des Fruchtfleisches besteht nach GRIEBEL und BARNES (13) aus 25% Neutralfett und 75% Fettsäuren. SCHWENKER und KLOSS (14) bestätigten kürzlich durch gaschromatographische und IR-spektroskopische Untersuchungen im wesentlichen die Ergebnisse von SHERMAN und BRIGGS (15), nach denen folgende Fettsäuren frei oder teilweise als Aethylester im fetten Oel vorkommen: Capron-, Capryl-, Caprin-, Laurin-, Palmitin- und Oelsäure. Der Geruch des fetten Oeles wird auf den Gehalt an Capron- und Caprylsäureaethylester zurückgeführt. Zusätzlich fanden SCHWENKER und KLOSS (14) Myristicinsäure und Valeriansäure als Aethylester. Im

Samenfett ist außerdem Stearinsäure nachzuweisen.

READ (23) berichtete, daß sich der Preßsaft frischer Früchte beim Stehenlassen in drei Schichten: ein "aetherisches Oel", ein fettes Oel und eine süßlich schmeckende wässrige Phase trennt. Das mit Wasserdampf schwer flüchtige "aetherische" Oel, auch Palmettooel genannt, riecht stechend und erzeugt Kopfschmerzen. SHERMAN und BRIGGS (15) fanden bei der Untersuchung des Fruchtfleisches fast reifer Früchte, daß diese 1,5% des schwer wasserdampfllüchtigen Oeles enthielten, das sich mittels Vakuumdestillation fraktionieren ließ: es bestand zu 63% aus freien Fettsäuren und zu 37% aus Aethylestern derselben. Das Auftreten größerer Mengen eines aetherischen Oeles in einer Palmenart war unerwartet und beschäftigte bald verschiedene Arbeitskreise. SCHREINER (16) verweist darauf, daß SHERMAN und BRIGGS alkoholkonservierte Früchte untersuchten. Er selber wies nach, daß an der Luft getrocknete Beeren nur Spuren eines "aetherischen" Oeles liefern. Das Auftreten eines "aetherischen" Oeles mußte also irgendwie mit dem beim Konservieren oder Extrahieren verwendeten Alkohol zusammenhängen. MANN (17) klärt diese Frage folgendermaßen: frische Früchte enthalten aktive Lipasen und liefern Spuren eines "aetherischen" Oeles, das ausschließlich aus freien Fettsäuren besteht. Bei der Konservierung in Aethanol werden die Fettsäuren mit dem Alkohol verestert. GRIEBEL und BARNES (13) bestätigten diese Befunde.

SCHINDLER (2) erwärmte eine Probe der Urtinktur mit Natriumamalgam und konzentrierter Salzsäure und erhielt eine kräftig orangefarbene Lösung. Er vermutete daraufhin das Vorhandensein eines Oxyflavons. Zugleich gibt er an, daß die Shinodareaktion (19) mit Magnesium und Salzsäure aus einer Probe der handelsüblichen Urtinktur Sabal serrulatum und ebenso die Reduktionsprobe mit Zink und Salzsäure negativ ausfallen. Nach GRIEBEL (20) enthalten die Früchte einen Gerbstoff, den SCHINDLER als nicht zu den Pyrogallolgerbstoffen gehörend betrachtet.

B) Pflanzenstoffe mit hormonartiger Wirkung,
insbesondere Oestrogene aus Pflanzen

LOEWE, DOHRN und FELLNER (25-27) beschrieben 1926 zuerst, daß bestimmte Pflanzenstoffe im Tierorganismus als Oestrogene wirken können. Nach der Entwicklung des Allen-Doisy-Testes hatte man die Möglichkeit, Reinstoffe und Pflanzenauszüge, die als oestrogen wirksam angesehen werden, exakt auf ihren Wirkungsgrad zu prüfen.

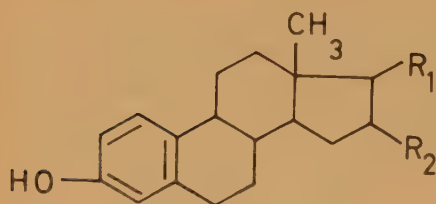
Eine solche oestrogene Wirksamkeit findet man nicht nur bei den im Säugetierorganismus vorkommenden Steroidhormonen Oestradiol, Oestron und Oestriol, sondern, wie die tierexperimentellen Versuche ergaben, auch bei vielen anderen, meist phenolischen Verbindungen (28), die natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können. Allgemein bezeichnet man solche Stoffe, die im Tierorganismus die Wirkung von Hormonen entfalten, als Zoonormone.

In den letzten vierzig Jahren wurden zahlreiche Pflanzenextrakte auf ihren Gehalt an oestrogenen Wirkstoffen geprüft. Dabei wurde beobachtet, daß es Pflanzenstoffe gibt, die in ihrem chemischen Aufbau mit den Zoonormonen nicht übereinstimmen, jedoch deren biologische Funktion übernehmen können. Sie gehören folgenden Stoffgruppen an:

1) Steroide

Die von DOISY, MARIAN und BUTENANDT (29-34) im Tierorganismus nachgewiesenen Oestrogene Oestron und Oestriol kommen auch im Pflanzenreich vor (35) und werden nach LOEWE (36) als pflanzliche Thelykinine bezeichnet. Welche physiologische Rolle ihnen im pflanzlichen Organismus zukommt, ist noch nicht bekannt. Die erstmalige Isolierung eines kristallinen pflanzlichen Thelykinins und die Identifizierung mit dem Oestron gelang BUTENANDT und JACOBI aus den Palmkernpreßrückständen (*Elaeis guineensis* Jacq.) (37). Oestriol wurde von SKARZYNSKI (38;39) aus den Weidenkätzchen (*Salix caprea* L.) isoliert. Nach neueren Untersuchungen (54;55) wirkt das in Pflanzen weitverbreitet vorkommende β -Sitosterin in

bestimmten Dosierungen im Tierorganismus oestrogen (111).

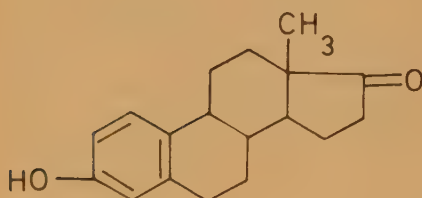


$R_1 = OH; R_2 = H$

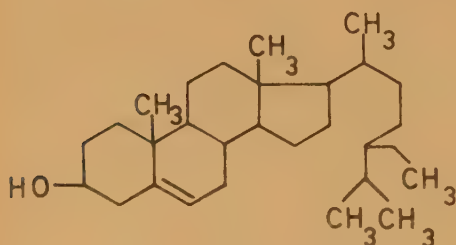
Oestradiol

$R_1 = R_2 = OH$

Oestriol



Oestron

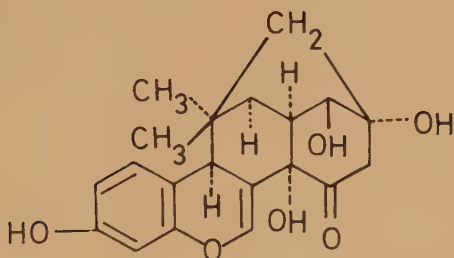


B-Sitosterin

2) Chromenderivate

Die Ordnung der Leguminosae ist in bezug auf Pflanzen mit oestrogenen Wirkstoffen bisher am eingehendsten studiert worden (28). SCHOELLER, DOHRN und HOLWEG (40) isolierten eine hochwirksame Substanz aus *Pueraria mirifica* mit der Summenformel $C_{20}H_{22}O_6$. TAYLOR, HODGKIN und ROLLET (41) konnten röntgenstrukturanalytisch dieser Summenformel ein kompliziertes 5-Ringsystem mit einer phenolischen und drei alkoholischen Hydroxylgruppen

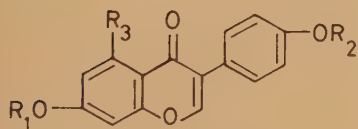
zuordnen, sie nannten dieses Chromenderivat Mir-
oestrol.



Miröstrol

3) Isoflavone

Schwächer oestrogen wirksam waren die von BRADBURY und WHITE aus *Trifolium subterraneum* L. kristallin erhaltenen Isoflavone Genistein und Formononetin (42). Aus *Trifolium pratense* L. wurden der 4'-Methylaether des Genisteins (Biochanin A) (43), aus Soja hispida L. und *Lupinus Polyphyllus* das 7-Glukosid des Genisteins (44), aus den Wurzeln von Puerariaarten Daidzein (45) und aus *Prunus puddum* Roxb. das Prunetin (46) isoliert.



R₁=R₂=H; R₃=OH Genistein

R₁=H; R₂=CH₃; R₃=H Formononetin

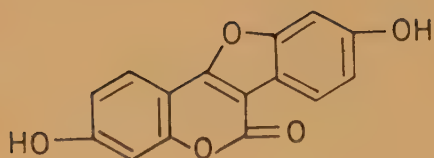
R₁=H; R₂=CH₃; R₃=OH
Biochanin A

R₁=R₂=R₃=H Daidzein

R₁=CH₃; R₂=H; R₃=OH
Prunetin

4) Cumarinderivate

Auszüge aus *Trifolium repens* L. hielt man lange für oestrogenfrei, bis BICKOFF (47) daraus das Cumarin-

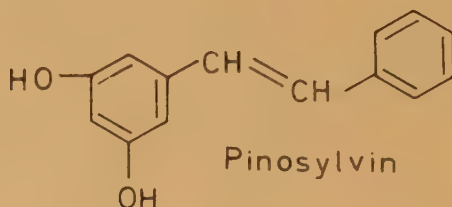


Cumöstrol

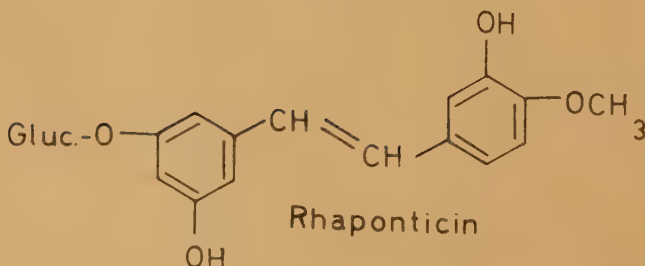
derivat Cumoestrol isolierte, dessen Wirkung mit der von Isoflavonen zu vergleichen ist und dessen Struktur durch Synthese bewiesen werden konnte.

5) Stilbene

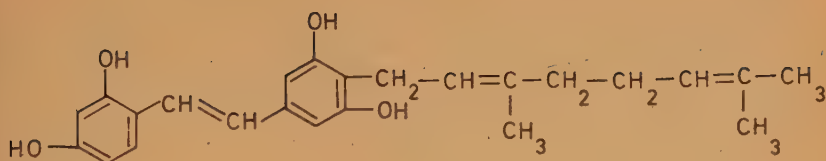
Vergleichbar mit der oestrogenen Wirksamkeit der Isoflavone ist die der Stilbenderivate mit einer Hydroxylgruppe in p-Stellung. Stilbenderivate mit zwei Hydroxylgruppen in p- und p'-Stellung werden als wirksamer und dann vergleichbar mit dem Pinosylvin aus Pinusarten (64), Chlorophorin aus Chlorophora excelsa Benth. und Hook. f. (63) sowie Rhaponticin aus Rheum raponticum (49) angesehen.



Pinosylvin



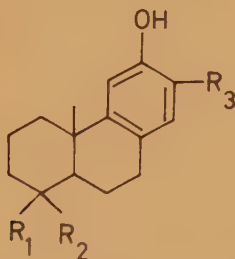
Rhaponticin



Chlorophorin

6) Hydrophenantrenabkömmlinge

FIESER und CAMPBELL (50) berichten, daß das aus Abietinsäure erhaltene 6-Hydroxyabietinol eine beachtliche oestrogene Aktivität zeigt. Unabhängig davon wurde das Podocarpinol von BRANDT und ROSS sowie ZEISS und Mitarbeitern als oestrogen wirksam erkannt (51;52). Ebenso wirksam soll das 7-Isopropylderivat des Podocarpinols (53) sein. Diese Oestrogene sind von den Harzsäuren Abietinsäure und deren Isomeren abzuleiten, die charakteristische Bestandteile des Harzes von Pinusarten sind.



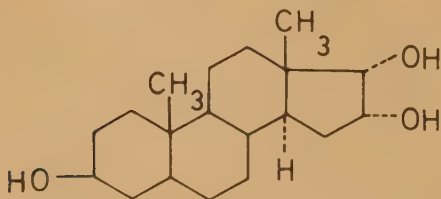
$R_1 = \text{CH}_3; R_2 = \text{CH}_2\text{OH}; R_3 = \text{H}$ Podocarpinol

$R_1 = \text{CH}_2\text{OH}; R_2 = \text{CH}_3; R_3 = \text{CH} \begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix}$ 6-Hydroxydehydroabietinol

Im Säugetierorganismus regulieren die glandotropen Hormone des Hypophysenvorderlappens die Tätigkeit einer ganzen Reihe von Drüsen mit innerer Sekretion. Umgekehrt können die von den untergeordneten Drüsen auf den Reiz der Hypophyse produzierten Hormone auf diese zurückwirken und die Ausschüttung des übergeordneten Hormons

hemmen. Man spricht hier von einem Rückkopplungsmechanismus. In diesem Zusammenhang interessieren nur die gonadotropen HVL-Hormone: FSH und besonders LH und LTH. Das FSH stimuliert im weiblichen Säugetierorganismus das Follikelwachstum. Das LH setzt die Sekretion von Oestrogen in Gang und bewirkt anschließend die Umwandlung des Follikels in den Gelbkörper. Das LTH regt die Produktion des Progesterons im Gelbkörper an (161).

Es gibt nun Pflanzeneiweiße, die in ihrer Wirkung dem LH und LTH ähneln. Derartige Verbindungen wurden von EL RIDI (56) aus den Pollenkörnern der Dattelpalme (*Phoenix dactylifera*) isoliert. Neu und überraschend war, daß in einzelnen Pflanzen Stoffe vorkommen, die imstande sind, die Sexualhormone in vitro und vivo zu inaktivieren: beispielsweise Extrakte aus weißen Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) (57;58). Wässrige Auszüge aus *Lithospermum ruderales* (Borraginaceae) haben die Fähigkeit, die Wirkung gonadotroper Hormone sowie die von thyreotropen Hormonen abzuschwächen oder völlig aufzuheben. Der europäischen Art *Lithospermum officinale* kommen diese Eigenschaften ebenso zu (59). Auch gibt es Stoffe pflanzlicher Herkunft, die im Tierorganismus eine Wirkung ausüben, wie man sie bisher nur von Androgenen und gonadotropen Hormonen her kannte (60;61). ZALKOW isolierte aus der Composite *Applopappus heterophyllus* ein 5α -Androstan- 3β , 16α , 17α -triol (62).

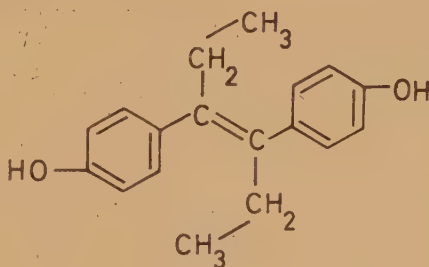


Damit ist erstmalig das Vorkommen der Androsterinderivate im Pflanzenreich nachgewiesen.

5α -Androstan- 3β , 16α , 17α -triol

MIESCHER und HEER (160) erhielten nach Aufspaltung des Ringes D im Oestron eine als Doisy-nolsäure bezeichnete Carbonsäure, die das Oestron in seiner oestrogenen Wirkung sogar übertraf. Weitere Versuche ergaben, daß sich auch die Ringe C und B des Steringerüsts öffnen lassen und man Verbindungen mit gleicher oestrogenen Wirksamkeit erhält. Im Diaethylstilboestrol, das synthetischen Ursprungs ist, fehlen die Ringe B und C, das Molekül ahmt jedoch den räumlichen Bau des Oestrone nach und die sauerstoffhaltigen Substituenten sind in einem Abstand angeordnet, der mit dem des Oestrone und Oestradiols vergleichbar ist (163). Es wird daher ein Zusammenhang zwischen Konstitution und Wirkung bei den Oestrogenen jeglicher Herkunft diskutiert und die vorstehende Übersicht

zeigt, daß die darinaufgezählten Beispiele durchaus für diese Theorie sprechen. Vertreter der oestrogen wirksamen Pflanzenstoffe mit nur einer Sauerstoff-Funktion in der beschriebenen Anordnung erweisen sich im pharmakologischen Test als schwächer wirksam.



Diaethylstilboestrol

C) Zur Biosynthese der pflanzlichen Sterine

Von den frühen Annahmen zur Biosynthese der Sterine beeinflussten vor allem zwei Hypothesen die experimentellen Arbeiten. Es waren dies die Hypothese nach RUZICKA vom einheitlichen Ursprung der Terpene und Steroide und die ROBINSONsche Hypothese, daß sich die Sterine durch Cyclisierung des Squalens bilden könnten.

BLOCH sah in der Anwendung des damals noch in der Entwicklung begriffenen Verfahrens der Isotopenmarkierung eine Möglichkeit, komplizierte Stoffwechselfragen, wie die Biosynthese der Sterine, erstmals eingehender zu untersuchen. Das Prinzip dieser Analysenmethode soll kurz beschrieben werden: Eine Verbindung, von der man annimmt, daß sie an einer bestimmten chemischen Reaktionsfolge teilnimmt, wird dadurch markiert, daß man ein Atom dieser Verbindung durch ein nach Möglichkeit radioaktives, normalerweise nicht in höheren Konzentrationen vorkommendes Isotop des betreffenden Elements ersetzt. Das in seiner Isotopenzusammensetzung künstlich veränderte Element wird Tracer genannt. Eine solche markierte Verbindung nimmt nun wie die nicht markierte Verbindung an der Reaktion teil und wird dementsprechend auch in die Endprodukte mit eingebaut. Hat man radioaktiv markiert, so kann man aus der spezifischen Aktivität des isolierten Endproduktes darauf schließen, ob die betreffende Substanz als Vorstufe an der Bildung des Endproduktes beteiligt ist. Als spezifische Aktivität wird die Aktivität je Gewichtseinheit oder Mol bezeichnet. Sie wird bei absoluten Messungen in mC je mg oder mMol angegeben. Die einer beliebigen Aktivität entsprechende Gewichtsmenge errechnet man nach der Formel:

$$G = \frac{A \cdot M \cdot T_{1/2}}{L \cdot \ln 2} \quad .$$

Dabei sind G das Gewicht in g, A die Aktivität in Zerfällen pro Sekunde ($3,7 \cdot 10^7$ Zerfälle pro Sekunde = 1 mC), M das Atomgewicht bzw. Massenzahlen des verwendeten Radioisotops, L die Loschmidtsche Zahl und $T_{1/2}$ die Halbwertszeit in Sekunden (65). In der Regel genügt es für Traceruntersuchungen, relative Intensitäten zu bestimmen, das Verfahren hat den Vorteil geringen apparativen Aufwandes. Die erhaltenen Werte hängen von der Art des benutzten Meßinstrumentes ab, sind jedoch bei gleicher Versuchsanordnung den absoluten Werten propor-

tional. Häufig benutzt man für relative Messungen das Geiger-Müller-Zählrohr oder die Photoplatte.

Prinzipiell ist es gleichgültig, ob man für Tracer-Messungen radioaktive oder stabile Isotope verwendet. Wesentlich ist dabei jedoch der Unterschied in der Meßtechnik und Meßgenauigkeit. Der empfindliche Nachweis unwägbare kleiner Substanzmengen radioaktiver Isotope ist schon mit einfachen Geräten wie einem Zählrohr oder der Ionisationskammer möglich. Die Messung des Mischungsverhältnisses stabiler Isotope erfordert hingegen den Einsatz eines Massenspektrometers. Bei quantitativen Messungen ist jedoch die Meßgenauigkeit wesentlich höher als die der Strahlungsmeßgeräte. So sind für biochemische Untersuchungen besonders Verdünnungsanalysen mit stabilen Isotopen vorteilhaft.

RITTENBERG und BLOCH (66) fütterten eine von TATUM (67) isolierte Mutante von *Neurospora crassa*, die zum Wachstum exogenes Acetat braucht, mit markiertem Acetat und beobachteten, daß diese Mutante das Ergosterin praktisch ohne Verdünnung des Isotops synthetisierte. ARIGONI (68; 69) wies an Sojakeimlingen den gleichzeitigen Einbau methyl- oder carboxylmarkierter Essigsäure in pentacyclische Triterpene vom β -Amyrin-Typ nach.

NICHOLAS gelang mittels

markierter Essigsäure

bei verschiedenen La-

biaten (71; 72) der

Nachweis der grund-

sätzlich gleichen

Bildung von Sterinen

und pentacyclischen

Triterpenen. Nachdem

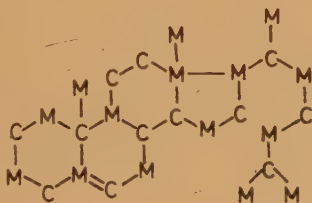
BONNER und ARREGUIN

(73) durch Untersu-

chungen über die Kaut-

schukbiosynthese gezeigt hatten, daß die Isoprenbau-

steine aus Acetat entstehen, entwickelte sich die Vor-



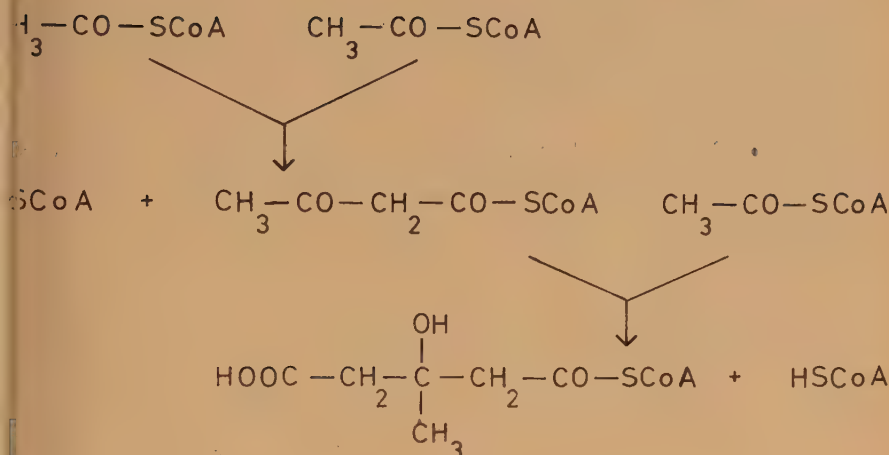
C: C-Atome vom Carboxylkohlenstoff

M: C-Atome vom Methylkohlenstoff

stellung, daß dieses Reaktionsschema auch für die Cholesterinbiosynthese zutrifft. Von den 27 C-Atomen des Cholesterins stammen 15 vom Methyl- und 12 vom Carboxylkohlenstoff der Essigsäure (siehe Formel Seite 27). Cholesterin, das lange Zeit als typisches Zoosterin angesehen wurde, konnte auch in Pflanzen nachgewiesen werden: in dem Schimmelpilz *Labyrinthula minuta* (74), in *Solanum tuberosum* und *Dioscorea spiculiflora* (75). Da die Ergebnisse der Tracer-Experimente für die Gültigkeit der Squalenhypothese in der Biosynthese der Pflanzensteroiden sprachen und man mit einer gleichartigen Bildung des Steroidgerüsts im pflanzlichen und tierischen Organismus rechnete, wurden die dann folgenden Versuche zur Biosynthese der Steroide fast ausnahmslos am Cholesterin angestellt.

Es galt nun zunächst in der Biosynthese das Bindeglied zwischen der Essigsäure und der biologischen Isopreneinheit zu finden. WRIGHT, FOLKERS und Mitarbeiter (76) fanden Mevalonsäure (3.5-Dihydroxy-3-methylvaleriansäure) als Acetatersatz für das Wachstum von *Lactobacillus acidophilus* ungewöhnlich wirksam. Nachdem TAVORMINA, GIBBS und HUFF (77) zeigen konnten, daß zellfreie Leberextrakte radioaktiv markierte Mevalonsäure in Cholesterin einbauen, war nicht mehr daran zu zweifeln, daß diese Mevalonsäure ein Bindeglied zwischen der Essigsäure und der biologischen Isopreneinheit ist. Die Mevalonsäure entsteht aber nicht direkt aus dem Acetat, sondern über die β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure als weiteres Zwischenprodukt. RUDNEY und LYNEN (78;79) bewiesen experimentell, daß die Biosynthese der β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure auf dem ersten der folgenden möglichen enzymatischen Synthesewege erfolgt:

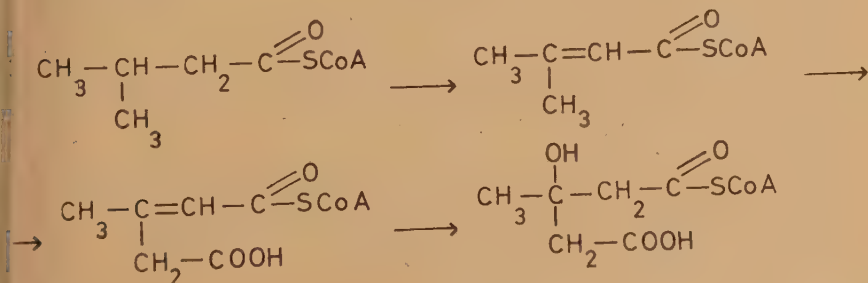
1) Zwei Moleküle aktivierte Essigsäure treten zu Acetoacetyl-CoA zusammen und ein drittes Acetyl-CoA wird aldolartig addiert:



β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA

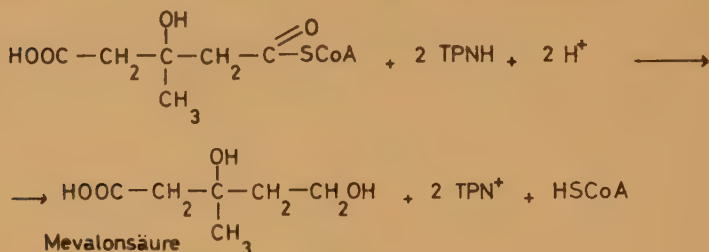
Das für diesen Reaktionsablauf erforderliche Acetyl-CoA liefern der Fettsäureabbau und der Abbau der Kohlenhydrate.

2) Eine weitere Möglichkeit zur Biosynthese der β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure besteht darin, daß das Leucinabbauprodukt Isovaleryl-CoA zur ungesättigten Verbindung dehydriert, unter Beteiligung von Biotin-aktiviertem Kohlendioxyd carboxyliert und an das Reaktionsprodukt Wasser angelagert wird (80). Es entsteht β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure in Form der CoA-Verbindung.



β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA

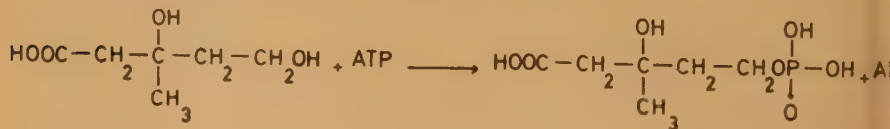
Die folgende Formulierung der nächsten Reaktionsschritte lag nahe: β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA und Mevalonsäure besitzen das gleiche Kohlenstoffgerüst, unterscheiden sich jedoch in ihrem Oxydationszustand. Tatsächlich konnte ein Enzym in Hefe- und Leberextrakten nachgewiesen und angereichert werden, das die Reduktion von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA zu Mevalonsäure in Gegenwart von TPNH katalysiert (81; 82; 83). In solchen angereicherten



Hefe- und Leberextrakten ließ sich auch Mevalonsäure weiter in Squalen überführen, wenn dem System Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen, ATP als Energiequelle, sowie TPNH oder DPNH als Reduktionsmittel zugesetzt wurden.

Versuche von ANDERSON, NORGARD und PORTER (84) ergaben, daß reifende Tomaten aus 2- ^{14}C -Mevalonsäure radioaktives Squalen synthetisieren.

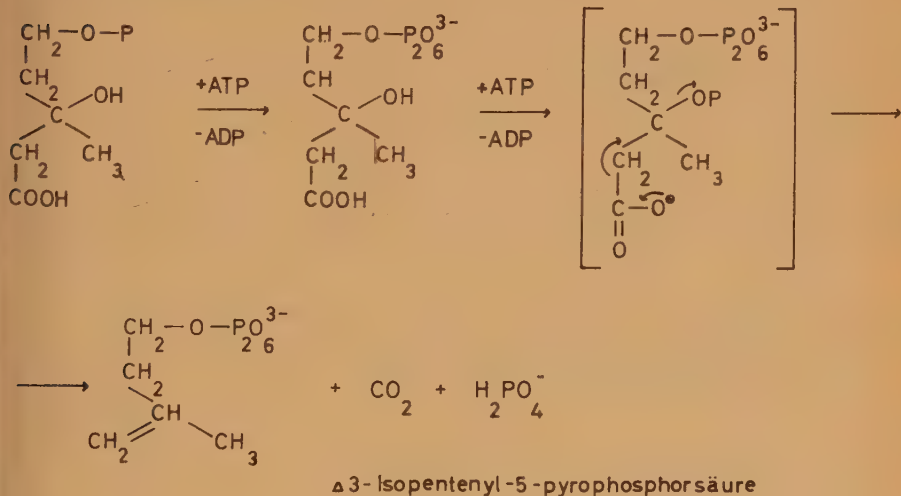
Nunmehr müssen folgende Reaktionen ablaufen, um von der Mevalonsäure zur biologischen Isopreneinheit zu gelangen: zunächst wird Mevalonsäure durch ATP in 5-Phosphomevalonsäure überführt:



5-Phosphomevalonsäure

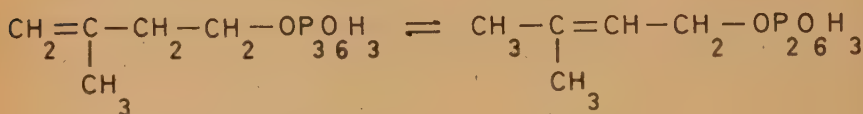
Die Phosphomevalonsäure wird durch ein anderes Enzym

in Gegenwart von ATP zur Pyrophosphomevalonsäure phosphoryliert. In der folgenden Reaktion wird unter Verbrauch von ATP, unter Bildung von Orthophosphorsäure und Abspaltung von CO_2 direkt Δ^3 Isopentenylpyrophosphat gebildet, das von LYNNEN und BLOCH später als "aktives Isopren" bezeichnet wurde. Diese Fakten erklärt am besten der folgende, von LYNNEN vorgeschlagene Syntheseweg:



Chemisch interessant auf dem Wege von der Mevalonsäure zum Isopentenylpyrophosphat ist die β -Eliminierung am Mevalonsäure-5-pyrophosphat, die bei Gegenwart von ATP stattfindet. Nach ihren Untersuchungen mit deuterierten Verbindungen hatten RILLING, TCHEN und BLOCH (85) schon vermutet, daß diese Reaktion nach einem Synchronmechanismus verläuft. Später konnten sie experimentell bestätigen, daß gereinigte Anhydrocarboxylase die gleichzeitige Abspaltung der Carboxylgruppe und der OH-Gruppe am tertiären Kohlenstoffatom katalysiert. Nach Versuchen mit O^{18} erhaltene Ergebnisse (86) sprachen für eine intermediäre Bildung von 3-Phospho-

mevalonsäure-5-pyrophosphat. ATP soll dabei als Phosphorylierungsmittel für die OH-Gruppe am tertiären Kohlenstoffatom wirken und deren Eliminierung fördern. Die Bildung des Squalens aus dem aktiven Isopren erfolgt nunmehr auf folgendem Wege: LYNEN bewies experimentell (87), daß unter der Einwirkung von Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase das Isopentenylpyrophosphat teilweise in die $\Delta^{2,3}$ -Verbindung, das γ,γ -Dimethylallylpyrophosphat umgelagert wird. Aus dem γ,γ -Dimethylallylpyrophosphat



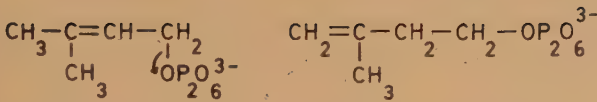
Isopentenylpyrophosphat

γ,γ -Dimethylallylpyrophosphat

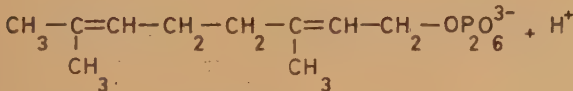
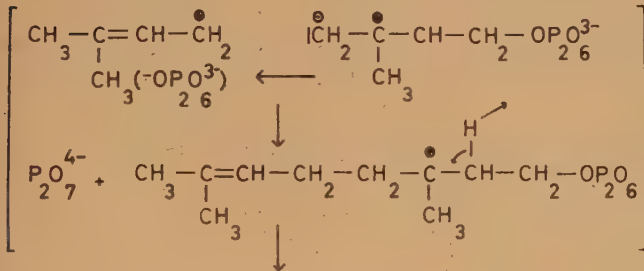
wird enzymatisch leicht ein Pyrophosphation abgespalten, das Carbenium-Kation lagert sich an die Doppelbindung eines Isopentenylpyrophosphats an und es entsteht unter Abspaltung eines Protons das Geranylpyrophosphat, das mit einer weiteren C 5 - Einheit zu Farnesylpyrophosphat verknüpft wird.

Farnesylpyrophosphat wird seinerseits in Squalen eingebaut, wie ANDERSON, NORGARD und PORTER mit C¹⁴ markiertem Ausgangsmaterial an isolierten Tomaten- und Mohrrübenplastiden zeigen konnten (84). Außerdem berichtete POPJAK, daß Farnesylpyrophosphat im pflanzlichen und tierischen Organismus eine Vorstufe des Squalens ist (88). Dieses Squalen wurde mit tierischem Enzym in markiertes Cholesterin übergeführt. Das beweist, daß pflanzliches und tierisches Squalen vor allem auch sterisch übereinstimmen.

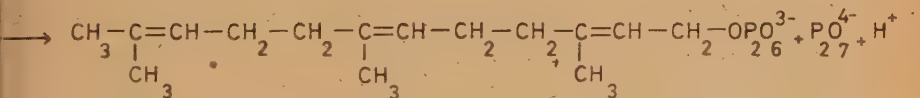
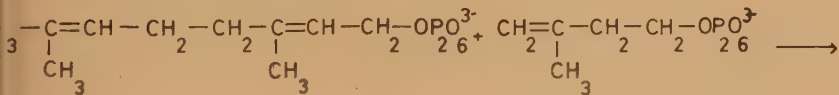
Nach BLOCH (66) ist die Polymerisation von C5-Einheiten durch Verknüpfung über Methylengruppen unter den enzymatischen Reaktionen zur Bildung von C-C-Bindungen einmalig.



γ,γ -Dimethylallylpyrophosphat Isopentenylpyrophosphat



Geranylpyrophosphat



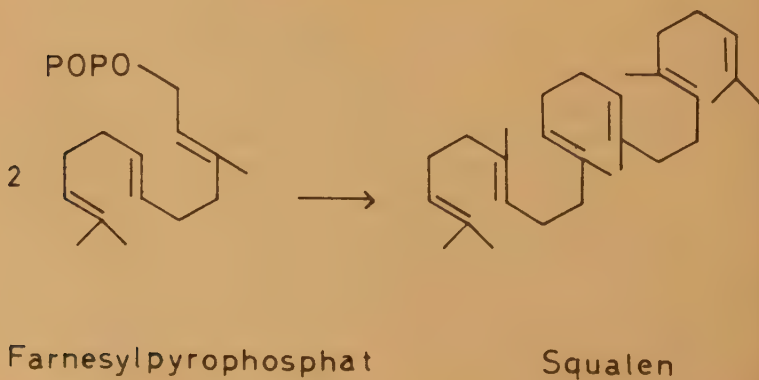
Farnesylpyrophosphat

Schema 1: Mechanismus des Biosyntheseweges vom Isopentenylpyrophosphat zum Farnesylpyrophosphat (modifiziert nach 121)

Die einleitende Umsetzung zwischen zwei C-5-Einheiten und die anschließende Addition von C5-Resten sollen synchron verlaufen. Sie lassen sich als nucleophile Angriffe der Elektronen der Exomethylengruppe des Isopentenylpyrophosphats auf ein Kation deuten, das durch Eliminierung von Pyrophosphat aus einem Allylpyrophosphat entsteht. Die Bedeutung der Isomerase für diesen

Reaktionsverlauf liegt darin, daß sie durch Isomerisierung des Isopentenylpyrophosphats das Allylderivat zur Verfügung stellt, mit dem die Verknüpfung von C₅-Einheiten zu Terpenkohlenstoffketten erst ausgelöst werden kann. Sobald dieser Prozeß begonnen hat, läuft er ohne neuerliche Isomerisierung weiter, er wird wahrscheinlich nur durch die Spezifität der am Polymerisationsvorgang der C₅-Einheiten beteiligten Enzyme begrenzt. Zwei Beispiele einer relativ hohen Kettenlängenspezifität sind bereits bekannt. Von LYNEN und POPJAK (89;90) aus Hefe und Leber gewonnene Farnesylpyrophosphat-Synthase liefert zum größten Teil oder sogar ausschließlich Farnesylpyrophosphat. Längere Ketten werden bedeutend langsamer gebildet. Ein weiteres spezifisches Enzym wurde von BLOCH (91) aus *Micrococcus lysodeicticus* isoliert: die Terpen-Synthase, die vor allem Geranylgeranylpyrophosphat, sicher aber kein C₁₅-Pyrophosphat synthetisiert.

Auf der Stufe des Farnesylpyrophosphats können die natürlich vorkommenden Sesquiterpene, das Squalen und die cyclischen Triterpene sowie die Sterine im Verlauf sekundärer Reaktionen, die nach Art bekannter Cyclisierungs-, Umlagerungs- und Oxydationsreaktionen verlaufen, entstehen. Die Squalenbildung kann man sich als Dimerisierung zweier Farnesyleinheiten vorstellen und LYNEN zeigte, daß es sich dabei um zwei Moleküle Farnesylpyrophosphat handelt.



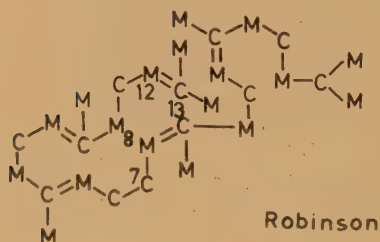
Hier liegt eine Wechselwirkung zwischen zwei reaktionsfähigen Methylengruppen vor; jedoch verläuft die Umsetzung reduktiv. BLOCH konnte bei der Synthese von Squalen aus Mevalonsäure beobachten, daß TPNH vorhanden sein muß. Außerdem handelt es sich bei der Farnesyl-Dimerisierung um eine Umsetzung zweier gleichartiger Gruppen: Schwanz-Schwanz-Verknüpfung, im Gegensatz zur Kopf-Schwanz-Verknüpfung bei der C5+C5-Kondensation der Isopentenyleinheiten, zu der kein Reduktionsmittel erforderlich ist.

Aus den Untersuchungen von CORNFORTH und POPJAK (92) kennt man den sterischen Verlauf dieser Dimerisierungsreaktion. Der eigentliche Mechanismus ist unbekannt. Ein Detail konnte BLOCH (93) klären, nämlich daß nur eines der an den reagierenden Zentren stehenden Wasserstoffatome bei der C15+C15-Kondensation ersetzt wird. CORNFORTH und POPJAK stellten zwei Hypothesen auf, nach denen entweder eine der Farnesyleinheiten vor der Kondensation zu einem Derivat vom Neridoltyp isomerisiert oder ein enzymgebundener Farnesylrest einer Stevens-Umlagerung (94) unterliegt.

Die letzten Schritte der Cholesterinbiosynthese sind noch kaum enzymatisch charakterisiert, man kennt nur Zwischenprodukte und weiß, daß einige Stufen der Umwandlung die Abspaltung der Methylengruppe an C 14 und C 4, die Reduktion der Isopentenylseitenkette und die Verschiebung der Doppelbindung aus der 8,9 - in die 5,6-Stellung des Ringsystems sind.

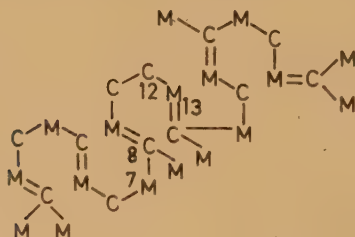
LANGDON (95) konnte in der Rattenleber Squalen aus markiertem Acetat gewinnen, das sich am ganzen Tier als Cholesterinvorstufe nachweisen ließ. NICHOLAS (96) gelang an *Ocimum basilicum* ein indirekter Beweis der biosynthetischen Beziehung zwischen Squalen und den Sterinen. Nach Zufuhr von markierter Mevalonsäure ließen die Zeit-¹⁴C-Kurve für Squalen und die Anstiegsrate der spezifischen Aktivität von β -Sitosterin darauf schließen, daß Squalen eine Vorstufe des Sterins ist.

MAUGDAL, TCHEH und BLOCH (97) bewiesen die Squalen-Cholesterin-Umlagerung endgültig mit authentischem, chemisch synthetisierten (^{13}C)-all-trans-Squalen. ROBINSON nahm 1934 zunächst an, daß sich das Squalen in der folgenden Weise falten könnte:



M: C-Atom vom
Methylkohlen-
stoff
C: C-Atom vom
Carboxyl-
kohlenstoff

Nachdem RUZICKA (98) 1952 gezeigt hatte, daß Lanosterin die Struktur des 4,4,14-Trimethylcholans hat, schlug WOODWARD in der Folge eine neue Art der Squalenfaltung vor und setzte das Lanosterin zwischen Squalen und Cholesterin in die Biosynthesekette.



Dabei unterschied sich die Verteilung der Acetat-Kohlenstoffatome im Cholesterin an den Kohlenstoffatomen C 7, C 8, C 12 und C 13 von der Verteilung nach dem Cyclisierungsschema von ROBINSON.

BLOCH (99; 100) bewies, daß das Kohlenstoffatom 13 des Cholesterins aus einer Acetatmethylengruppe hervorgeht und die Stellung des C 7. CORNFORTH und POPJAK

klärten mit ihren Arbeiten über den vollständigen Abbau des Cholesterins die Stellung der Kohlenstoffatome 8 und 12 in Übereinstimmung mit der WOODWARDschen Hypothese.

RUZICKA zeigte den gemeinsamen biogenetischen Ursprung der Terpene und Steroide. Das führte zu einer verfeinerten Formulierung des Mechanismus der Cyclisierung des Squalens zum Lanosterin. Er definierte in der biogenetischen Isoprenregel (101) Terpene als Verbindungen, deren Kohlenstoffgerüst sich aus aliphatischen Vorstufen vom Typ des Geraniols, Farnesols, Gernylgeraniols und Squalens nach bekannten Cyclisierungs- und Umlagerungsmechanismen der organischen Chemie ableiten lassen. Diese Ableitung führt entweder zu genauen Strukturformeln der Naturverbindungen oder zu Analoga, von denen man erst durch Oxydations- und Reduktionsreaktionen zu den Naturverbindungen gelangt. Eine Ableitung der Stammvertreter der cyclischen Triterpene ausgehend vom Squalen gelang RUZICKA unter Einhaltung folgender Regeln:

- a) Die Cyclisationen sollen ausnahmslos nach dem Schema der antiparallelen Addition erfolgen
- b) Wagnersche Umlagerungen des Kohlenstoffgerüsts, 1,2-Wanderungen von Methylgruppen und H-Atomen sowie H-Eliminationen sollen nur in solchen Fällen auftreten können, wo die entsprechend optimalen stereochemischen Voraussetzungen erfüllt sind
- c) Alle Teilreaktionen vom Squalen bis zu den Endprodukten sind Nonstop-Reaktionen, d.h. es sollen keine stabilen Verbindungen, die durch Absättigung (Hydratation, H-Elimination) der (+)-Ladung bei Zwischenstufen während der Cyclisation entstehen können, als Zwischenprodukte auftreten.

Bei einem Ringschluß nach diesem Schema müssen die an der Reaktion beteiligten Doppelbindungen in einer Konstellation vorliegen, in der die Sessel- oder Wannenform des Cyclohexans bereits vorgebildet ist.

Der äquatoriale Angriff eines Kations an dem entfernten Ende der ersten Doppelbindung hat zur Folge, daß die π -Elektronen der zweiten Doppelbindung an dem näheren, nun positivierten Ende der ersten Doppelbindung parallel zur Angriffsline des auslösenden Kations, aber in entgegengesetzter Richtung, angreifen unter Bildung eines nichtklassischen Ions (II). Die Angriffslinien der beiden an die erste Doppelbindung zu addierenden Substituenten sind also parallel, aber einander entgegengerichtet, daher die Bezeichnung "antiparallele" Addition (I).



I)

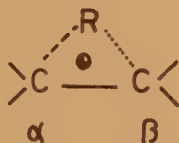


II)

Wenn nun durch die geeignete Faltung einer längeren Kette die Möglichkeit zu weiteren Cyclisierungen besteht, so werden nach dem gleichen Schema die π -Elektronen der nächsten Doppelbindung sofort an dieses nichtklassische Ion addiert. Die Reaktion kommt dann erst zum Stillstand, wenn keine Doppelbindungen in geeigneter Lage mehr vorhanden sind. Es handelt sich um eine Nonstop-Reaktion, die stereospezifisch verlaufen muß, weil in den nichtklassischen Ionen die reagierenden C-Atome und ihre Substituenten in einer bestimmten Anordnung fixiert sind. Würde man nicht diesen Nonstop-Mechanismus annehmen, so müsste man mit der Entstehung von Stereoisomeren rechnen, da die Substituenten an einem klassischen Carboniumion in einer Ebene angeordnet sind und dann der Angriff eines Reaktionspartners prinzipiell von beiden Seiten her erfolgen kann.

Der Unterschied zwischen klassischen und nichtklassischen Ionen lässt sich folgendermaßen veranschaulichen: ein gegebenes klassisches Carboniumion kann sich grundsätzlich auf verschiedene Weise stabi-

sieren: einmal durch Kombination mit einem Anion, diese Möglichkeit soll hier nicht berücksichtigt werden. Zweitens kann es sich in ein anderes klassisches Carboniumion umlagern, das energieärmer als das Ausgangsion ist, und zwar unter Ablösung und Wanderung eines Substituenten als Anion. Diese Umlagerung erfordert nach INGOLD (103) eine relativ hohe Aktivierungsenergie und verläuft daher ziemlich langsam. Rascher verläuft die Umlagerung hingegen, wenn die Energiedifferenz zwischen den beiden möglichen Carboniumionen sehr gering ist. In diesem Fall kann sich, ausgehend von jedem der möglichen klassischen Ionen ein relativ stabiler Zwischenzustand ausbilden, bei dem der wandernde Substituent keinem der beiden C-Atome ganz angehört. INGOLD (103) bezeichnet ein solches Ion als ein synartetisches Ion, andere Autoren sprechen von einem nichtklassischen Ion (104). Es wird allgemein durch die folgende Formel symbolisiert:



Von diesem synartetischen Ion aus kann sowohl eine Verbindung entstehen, in der das R gewandert ist, wie eine, bei der es sich an das gleiche Kohlenstoffatom, an dem sich R früher befand, begeben hat.

Der Ringschluß erfolgt dann nach dem Schema der antiparallelen Addition, wenn der Übergang des nichtklassischen Ions in die cyclische Form rascher erfolgt, als die Umlagerung des nichtklassischen Ions in die klassische Form (119). Das Geschwindigkeitsverhältnis hängt von der Lage des Gleichgewichtssystems zwischen den verschiedenen Konstellationen des Diens ab. Folglich wird die Cyclisation um so eher den stereospezifischen direkten Weg einschlagen, je mehr das Konstellationsgleichgewicht auf der Seite der geeignet

gefalteten Konstellation liegt.

Die Cyclisation vom Squalen zu Steroiden und Triterpenen stellt man sich folgendermaßen vor:

- a) Die Cyclisationen sollen an einem Squalen erfolgen, dessen vier mittlere Doppelbindungen trans-Konfiguration aufweisen.
- b) Die Cyclisation soll ausgehend von einer ganz bestimmten Folge von Sessel- (S) und Wannenfaltung (W) der Squalenkette erfolgen.

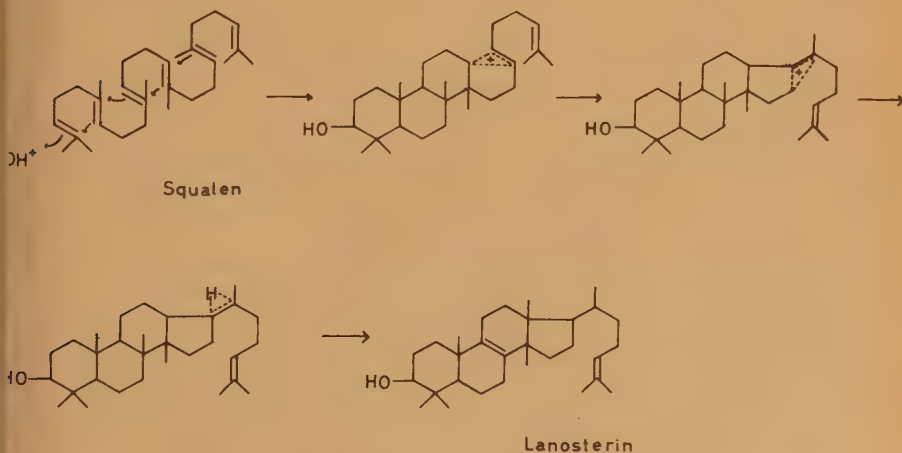
Bei der biologischen Synthese wird ein Enzym die zweckmäßige Faltung vorbereiten. Während das Enzymsystem der Tiere scheinbar auf die SWSW-Faltung des Squalens eingestellt ist, wird bei den Pflanzen zusätzlich die SSSW-Faltung angetroffen. Die Cyclisierung wird eingeleitet durch den Angriff eines Kations am späteren C-Atom 3; da alle natürlich vorkommenden Steroide und Terpene an diesem Kohlenstoffatom eine Sauerstoff-Funktion tragen, postulierte man als angreifendes Agens das OH^+ -Kation. TCHEN bestätigte experimentell, daß die OH-Gruppe am Kohlenstoffatom 3 des Cholesterins aus molekularem Sauerstoff, dem formalen Äquivalent des OH^+ -Kations entsteht und nicht aus dem Wasser. Aus dem SWSW-gefalteten Squalen bildet sich nach dem angegebenen Cyclisierungsschema zunächst ein tetracyclisches Carboanion, das sich vom Lanosterin darin unterscheidet, daß die anguläre Methylgruppe am späteren C-Atom 8 und nicht am späteren C-Atom 13 sitzt. Da das Lanosterin das erste faßbare Cyclisierungsprodukt ist, muß man eine zusätzliche Verschiebung dieser Methylgruppe annehmen. Dafür kamen eine 1-3-Wanderung oder zwei 1-2-Verschiebungen vom Typ der Wagner-Meerwein-Umlagerung in Frage. Die letztgenannte Möglichkeit war die wahrscheinlichere, weil die optimalen sterischen Verhältnisse gegeben sind. Diese optimalen sterischen Voraussetzungen für eine 1-2-Wanderung liegen vor, wenn ein-tretender und austretender Substituent axial und in trans-Stellung zueinander angeordnet sind. Auch diese

Umlagerungen erfolgen vermutlich über ein synar-tetisches Ion.

Diese Annahme konnte von CORNFORTH und POPJAK experimentell bestätigt werden. Es erfolgen 1-2-Verschiebungen vom C 14 zu C 13 und C8 an C 14. Sie konnten ferner aussagen, daß die Methylwanderung von C 14 an C 13 intramolekular und nicht intermolekular verläuft.

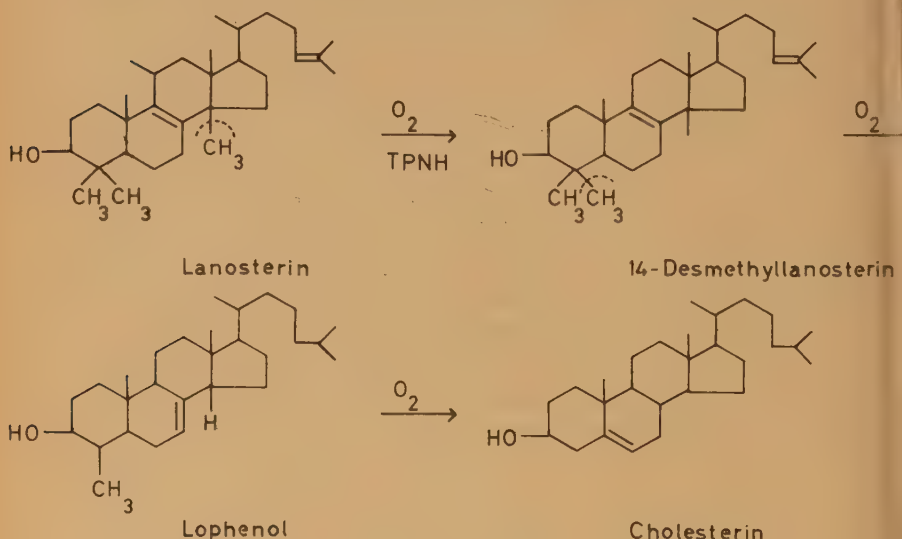
Die Cyclisierung des Squalens zum Lanosterin erfolgt also nach BLOCH folgendermaßen:

- a) Die Cyclisierung des Squalens zum Cholesterin beginnt mit dem Angriff eines OH^+ -Kations an dem Kohlenstoffatom 3 des späteren Steringerüsts.
- b) die Cyclisierung erfolgt nach dem Schema der anti-parallelen Addition und führt im Nonstop-Mechanismus zunächst zu einem tetracyclischen Carboniumion, das sich durch anschließende 1-2-Wanderungen von Hydrid-Ionen und Methylgruppen und abschließender Protonenabspaltung zum Lanosterin stabilisiert (siehe Schema 2).



Schema 2: Mechanismus der Cyclisierung vom Squalen zum Lanosterin (modifiziert nach (105))

Das Lanosterin ist aus Hefen (106), der Latex von *Euphorbia balsamifera* (107) und Maiskeimlingen (75) isoliert worden. Im Tierorganismus wird das Lanosterin durch Abbau der drei Methylgruppen an den Kohlenstoffatomen 4 und 14 in Cholesterin überführt (66). Ähnliche



Schema 3: Oxydative Entfernung der Methylgruppen vom Lanosterin und die letzten Stufen der Cholesterin-Biosynthese (modifiziert nach (66))

Demethylierungsprodukte wurden auch aus Pflanzen isoliert. Man kann also in der Pflanze in der Demethylierung tetracyclischer Triterpene den Biosyntheseweg zu den Sterinen vermuten. Das im Tierreich vorkommende Lophenol (4α -Monomethylsterin, Demethylierungsprodukt des Lanosterins) wurde von DJERASSI (108; 109) erstmalig aus dem Kaktus *Lophocereus schottii* isoliert. Spezifische pflanzliche Varianten zum Demethylierungsablauf im Tierorganismus stellen das natürliche Vor-

kommen von Cycloeucalenol (110) und Macdongallin (112) dar.

Das beim Cholesterin geschilderte Schema liefert aber nur ein Sterin mit 27 bzw. ein triterpenoides Sterin mit 30 C-Atomen, während die Phytosterine 28, 29, 30 und seltener sogar 31 Kohlenstoffatome besitzen. Auf grund der Biosynthesestudien weiß man heute, daß der Tierorganismus alle anderen Steroide aus dem Cholesterin aufbaut. Im Gegensatz dazu ist man im Pflanzenreich mit der Aufklärung des Biosyntheseweges der Steroide nicht so weit gelangt, obwohl es sehr wahrscheinlich ist, daß die Verhältnisse hier ähnlich liegen. In der Pflanze muß in einem zusätzlichen Reaktionsmechanismus an das Kohlenstoffatom 24 der Seitenkette eine Methyl- oder Aethylgruppe angegliedert werden. Bei dem C-28-Sterin Ergosterin konnte man zeigen, daß das zusätzliche C-Atom am C 24 nicht von der Essigsäure, sondern vom Methionin nach der Bildung des Grundgerüsts in die Seitenkette eingeführt wird (114; 115; 116). Eine ähnliche Reaktion vermutet man bei der Anknüpfung der Aethyl- oder Aethylengruppe am Kohlenstoffatom 24 der C-29-Sterine. Über den Ursprung dieser beiden zusätzlichen C-Atome liegen noch keine experimentell gesicherten Angaben vor.

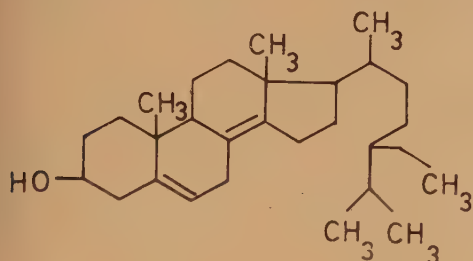
Unter den pflanzlichen Sterinen sind auch stärker hydroxylierte Verbindungen bekannt. FISCHER und MÄGERLEIN (117) isolierten aus *Aesculus hippocastanum* ein Δ^5 -Stigmasten- $3\alpha,7\alpha,22\alpha$ -triol. Da es erst im Laufe der Vegetationsperiode gebildet wird und selten vorkommt, ist anzunehmen, daß es stärker abgeleitet ist und durch Hydroxylierung einfacher Sterine entsteht. Es ist möglich, daß sich hierbei zunächst eine $\Delta^{24(28)}$ -ungesättigte Verbindung bildet, deren Reduktion sowohl 24 a- als auch 24 b-Isomere liefern kann. Die am häufigsten vorkommenden Pflanzensterine (z.B. β -Sitosterin) gehören der 24 b-Reihe an, während die Invertebraten bevorzugt 24 a-Sterine bilden (113). a und b sind Isomere, die sich durch die Anordnung an dem asymmetrischen Kohlenstoffatom 24 unterscheiden.

ein bis zwei Doppelbindungen, die bevorzugt an den Kohlenstoffatomen 5,7 und 22 lokalisiert sind (124), alle besitzen eine OH-Gruppe am Kohlenstoffatom 3, die mit Ausnahme einiger triterpenoide Steroide (nach KIPNIS (126) eine Gruppe von Naturstoffen, die sich vom trimethylierten Steran ableiten) β -ständig ist. Zusätzlich können auch weitere OH-Gruppen vorhanden sein. Am Kohlenstoffatom 17 befindet sich eine Seitenkette, die aus 8, 9 oder 10 C-Atomen bestehen kann und immer β -ständig angeordnet ist. Mit den neueren Vorstellungen über die Biosynthese ergab sich zwangsläufig, daß die vorher übliche scharfe Trennung zwischen Triterpenen und Steroiden nicht mehr aufrecht zu erhalten war. Die Übergänge sind fließend: so kann man beispielsweise die Verbindungen Lanosterin mit 30 und Cycloartenol mit 31 C-Atomen entweder als Methylsterine oder als tetracyclische Triterpene auffassen. Bei allen Verbindungen mit einer Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 22 und 23 besteht die Möglichkeit einer cis-trans-Isomerie, jedoch wurden solche mit cis-konfigurierter Seitenkette in der Natur nicht gefunden. Von den bei 10 asymmetrischen Kohlenstoffatomen in einem gesättigten Pflanzensterin möglichen 1024 stereoisomeren Formen kommen in der Natur nur sehr wenige vor. Unterschiede finden sich praktisch nur hinsichtlich der Anordnung am Kohlenstoffatom 24 in der Seitenkette. Die Ringe A, B und C sind bei der als Phytosterine bezeichneten Stoffgruppe ausnahmslos trans-verknüpft. Die angulären Methylgruppen sind definitionsgemäß β -ständig.

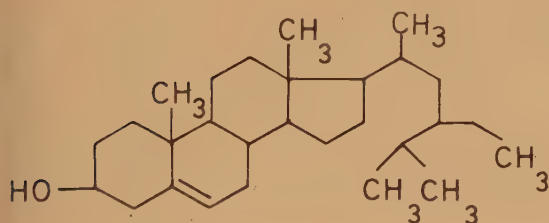
Das am längsten bekannte natürliche Sterin ist das Cholesterin, es wurde am Ende des 18. Jahrhunderts aus menschlichen Gallensteinen isoliert. 1862 wurde es von BENEKE (122) auch in pflanzlichem Material, den Samen von *Pisum sativum*, nachgewiesen. Nachdem HESSE (123) pflanzliche Sterine und Zoosterine unterschied, indem er für ein aus Calarbarbohnen isoliertes Sterin die Bezeichnung Phytosterin einführte, teilte man in der

Folge nach der Herkunft in Phytosterine, Zoosterine und Mycosterine ein. Später stellte sich heraus, daß gleiche Sterine in Tier- und Pflanzenorganismen vorkommen, wie das Beispiel des Cholesterin zeigt. Diese Einteilung nach der Herkunft ist daher nicht mehr streng durchführbar. Sterine sind in niederen und höheren Pflanzen gleichermaßen verbreitet, so daß man geneigt ist anzunehmen, daß das Steroidgerüst zur Grundausrüstung einer jeden lebenden Pflanzenzelle gehört (70). Die erste Beschreibung eines Sterins pflanzlicher Herkunft geht auf HUSEMANN zurück, wie sich erst später herausstellte, hatte er eine Mischung von Sitosterin und Stigmasterin untersucht. Das erste Sterin, das rein dargestellt und in seiner Konstitution aufgeklärt wurde, ist das Stigmasterin. Die Totalsynthese eines Steroids wurde zuerst von WOODWARD, SONDHEIMER, TAUB, HEUSLER und Mc LAMORE (125) beschrieben, nämlich des 3-Keto- $\Delta^{4,9(11)16}$ -ätiansäure-methylesters. Sterine kommen in der Pflanze frei, verestert und auch glykosidisch gebunden vor: beispielsweise enthält das Sojaoel Sitosterin frei, als Glykosid und als Ester (127). Steringlykoside pflanzlichen Ursprungs werden nach POWER und SALWAY (128) Phytosteroline genannt. Den Zuckeranteil dieser Glykoside bildet in der Regel Glukose, gelegentlich wurde D-Cymarose gefunden (129). Die Aglyka sind häufig Δ^5 -Sterine. Man kann sie einfach nachweisen, weil ihre optische Drehung in Pyridin in der Regel nicht größer als $(\alpha)_D = -40^\circ$ (130) ist. Steringlykoside anderer Gruppen, so beispielsweise das γ -Spinasterolglykosid sind ebenso bekannt (131). Die erste Spaltung eines Steringlykosides gelang POWER und SALWAY beim Ipuranol aus *Ipomoea purpurea* (128). In der Folge wurde diese Verbindung aus vielen anderen Pflanzen isoliert und unter den verschiedensten Namen beschrieben. SALWAY (132) stellte ein Steringlykosid aus Sitosterin und Acetobromglukose dar. Phytosteroline kommen nicht nur in höheren Pflanzen vor, sie wurden auch in Algen, beispielsweise *Nitella opaca*, gefunden (153).

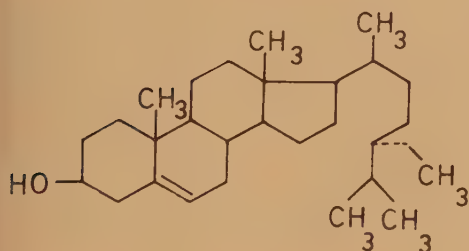
Die Hauptvertreter der pflanzlichen Sterine sind Stigmasterin und Sitosterin in komplexen, oft nur sehr schwer trennbaren Gemischen. Das gilt besonders für das Sitosterin. Diese ursprünglich als einheitlich angesehen Substanz mußte nach neueren Untersuchungen in die Komponenten: α , β , γ , δ - und ε -Sitosterin aufgeteilt werden,



α_1 -Sitosterin



β -Sitosterin



γ -Sitosterin

die sich vor allem durch ihre spezifische Drehung unterscheiden lassen und von denen das β -Sitosterin in der weitaus größten Menge vorkommt. α -Sitosterin bildet wiederum eine Mischung von α_1 -, α_2 - und α_3 -Sitosterin: α_1 -Sitosterin ist ein Isomeres des Stigmasterins (135; 136; 137) ($C_{29}H_{48}O$), α_2 -Sitosterin ist vermutlich eine

homologe Verbindung ($C_{30}H_{50}O$?) des α_1 -Sitosterins (135) und die Konstitution des α_3 -Sitosterins ($C_{29}H_{48}O$) ist noch unbekannt. Die Konstitution des β -Sitosterins ($C_{29}H_{50}O$) ist bekannt (138; 139), γ -Sitosterin unterscheidet sich nur in der sterischen Anordnung der Substituenten am C_{24} vom β -Sitosterin (140), die Konstitution des δ -Sitosterins (141) und ϵ -Sitosterins (142) sind noch unbekannt.

	Fp aus C_2H_5OH umkristall.	Fp aus CH_3OH umkristall.	$[\alpha]_D$ in $CHCl_3$
α_1 -Sitosterin	164-166°		$[\alpha]_D = -1,7^\circ$
α_2 -Sitosterin	156°		$[\alpha]_D = +3,5^\circ$
α_3 -Sitosterin	142-143°		$[\alpha]_D = +5,2^\circ$
β -Sitosterin	139-140°	137°	$[\alpha]_D = -36^\circ$
γ -Sitosterin	146-148°		$[\alpha]_D = -42^\circ$ bis -43°
δ -Sitosterin	146-147°		$[\alpha]_D = -23,9^\circ$
ϵ -Sitosterin	143-144°		$[\alpha]_D = -38,7^\circ$

Tabelle 1: Schmelzpunkte und spezifische Drehung der einzelnen Sitosterine (nach (142))

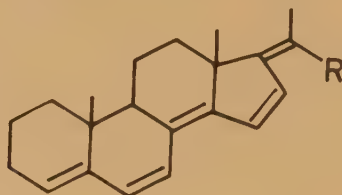
Bei der Extraktion pflanzlichen Materials mit lipophilen Lösungsmitteln findet man die Sterine mit den Pflanzenfetten zusammen vor, sie bleiben bei der Aufarbeitung im Unverseifbaren zurück. Die endgültige Isolierung der Sterine ist dann trotz des guten Kristallisationsvermögens schwierig, da sich die einzelnen Sterine in der Löslichkeit und den Schmelzpunkten meist nur

wenig voneinander unterscheiden und sie darüber hinaus miteinander gerne Mischkristalle bilden. Erschwerend kommt noch hinzu, daß sie sich (143) nicht nur wenig in ihren Schmelzpunkten unterscheiden, sondern außerdem bei den Sterinen häufig Polymorphieerscheinungen zu beobachten sind. In der Regel wird der Schmelzpunkt der stabilsten Form bestimmt, so ist es auch zu erklären, daß von vielen Sterinen bisher nur ein Schmelzpunkt bekanntgeworden ist. Ferner neigen Steroide im allgemeinen zur Bildung von Solvaten, auch dadurch können sich mehrere verschiedene Schmelzpunkte für eine Substanz ergeben. Infolge dieser erschwerten Reindarstellung und Identifizierung pflanzlicher Sterine erwiesen sich häufig neue Sterine später als schwer zu trennende Gemische bereits bekannter Verbindungen.

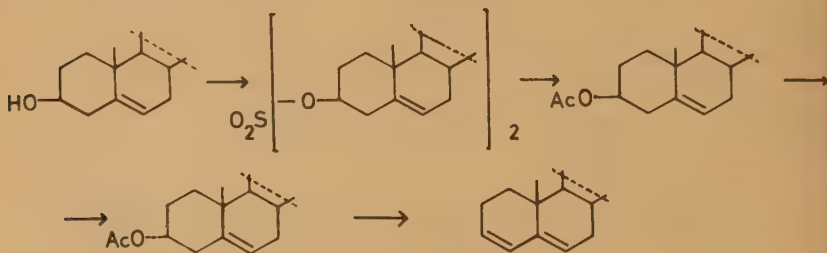
WHITBY (134) beschrieb eine Farbreaktion, die anscheinend typisch für Phytosteroline ist und zur Unterscheidung von hochschmelzenden Triterpenalkoholen zu gebrauchen sein soll: Man löst wenige mg Substanz unter Erwärmen in konzentrierter Schwefelsäure. Dann wird die Lösung abgekühlt und eine gesättigte wässrige Thymollösung hinzugefügt, ohne daß sich die beiden Lösungen mischen. Bei Anwesenheit von Phytosterolinen färbt sich die Unterphase orange und fluoresziert stark, hernach färbt sich die Grenzschicht violett, die Färbung geht später in die Oberphase über. Diese violette Farbreaktion wurde bei freien Sterinen nicht beobachtet. Zum schnellen Nachweis der Sterine dienen verschiedene Farbreaktionen, wie die nach Liebermann-Burchard, Salkowski und Rosenheim.

Insbesondere ist die Liebermann-Burchard-Reaktion mit Schwefelsäure in Essigsäureanhydrid zu erwähnen. Sie ist für Δ^5 -ungesättigte Sterine mit 3β -Hydroxylfunktion spezifisch und liefert nach einer nur kurze Zeit bestehenden Rosa- oder Blaufärbung eine grüne Farbreaktion. BRIESKORN und HOFMANN (48) empfehlen nur dann von einer positiven Liebermann-Burchard-Reaktion zu sprechen, wenn

die blaugrüne Endfarbe eine Absorptionsbande bei mindestens 605 nm aufweist. Mit dem Chemismus dieser Reaktion beschäftigten sich schon verschiedene Arbeitskreise. Alle führten übereinstimmend das Auftreten der Färbungen auf Dehydratisierungen und damit Ausbildung eines Systems konjugierter Doppelbindungen zurück. Nach BRIESKORN und HOFMANN (48) erfolgt der Aufbau einer Reihe von Doppelbindungen folgendermaßen: nach Dehydratisierung in Δ^3 erhält man aus Δ^5 -Sterinen ein $\Delta^3,5$ -Dien. Durch wiederholte Oxydation in Allylstellung zu einer vorhandenen oder gebildeten Doppelbindung und anschließende Dehydratisierung könnte eine Verlängerung des Systems erfolgen. Das von den Autoren vermutete Endprodukt - ein Pentaen - konnte bisher nicht isoliert werden.



Die ersten Reaktionsschritte formulieren die Autoren folgendermaßen:



Eine Verlängerung des konjugierten Systems erfolgt durch Ausbildung einer Doppelbindung am Kohlenstoffatom 7, das oxydativen Angriffen leicht zugänglich ist. Dieser

Angriff am C 7 scheint geschwindigkeitsbestimmend für den weiteren Reaktionsablauf zu sein. Die Autoren vermuten eine anschließende Verlängerung des Systems durch Ausbildung der Doppelbindungen Δ^{15} und $\Delta^{17(20)}$. Die Farbvertiefung ist vom Bau der Seitenkette, insbesondere der Liganden der C-Atome 17 und 20 abhängig. Beim Fehlen der C 17-Seitenkette tritt eine blaugrüne Färbung nicht auf, bei vorhandener Seitenkette entscheidet die Substitution am C 20. Befindet sich nämlich an dem C 20 eine Carbonyl- oder Hydroxylgruppe, dann verläuft die Liebermann-Burchard-Reaktion negativ, ebenso verhindert eine C 20(22)-Doppelbindung die Reaktion. Eine Kettenverlängerung und Verzweigung am C 24 verursachen eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums, ebenso bewirkt eine Doppelbindung in der Seitenkette eine Farbvertiefung. Die Polyenkette lagert in ihren polaren Grenzformen SO_3H^+ , OH^- oder HSO_4^- reversibel an und es wird eine maximale Farbvertiefung erreicht, wenn die angelagerten Ionen möglichst weit voneinander entfernt sind. Diese Liebermann-Burchard-Reaktion eignet sich auch gut zum Nachweis der Sterine in der Dünnschichtchromatographie. Als weitere Sprühreagentien zum Nachweis der Sterine eignen sich:

a) die allgemein verwendbaren Reagentien für Steroide:

1) Halbkonzentrierte oder konzentrierte Schwefelsäure, die verschiedene Färbungen und Fluoreszenzen liefert mit hoher Empfindlichkeit, jedoch geringer Spezifität.

2) Chlorsulfonsäure in Essigsäure gibt charakteristische Färbungen; die Empfindlichkeit dieser Reaktion ist so hoch, daß beispielsweise für das Cholesterin die Nachweisgrenze bei $0,025\mu$ liegt.

3) Halbkonzentrierte Phosphorsäure in wässriger oder aethanolischer Lösung liefert mit vielen Steroiden verschiedene Färbungen und Fluoreszenzen (145).

4) 5 - 10 %ige Phosphormolybdänsäurelösungen in Aethanol geben mit Sterinen im Chromatogramm blaue Flecke auf gelbem Grund, für Cholesterinester liegt die Erfassungsgrenze bei $< 0,5\mu\text{g}$ (145).

5) Ebenso zum Nachweis aller Klassen von Steroiden ist eine 5 - 50 %ige Lösung von Antimonpentachlorid in Chloroform geeignet.

Relativ spezifisch sind die folgenden Sprühreagentien

1) Bei der Nachbehandlung phosphorsäurebesprühter Chromatogramme mit einer Phosphormolybdänsäurelösung geben ungesättigte Sterole intensiv blaue Färbungen.

2) 3β -Hydroxy- 45 -Steroide färben sich im Chromatogramm nach Besprühen mit einer gesättigten Antimontrichloridlösung in Chloroform orange bis violett. Dieses Reagens gibt jedoch unterschiedliche Fluoreszenzreaktionen verschiedener Intensität mit allen Klassen von Steroiden. Einige Sterine können unbehandelt im UV-Licht beobachtet werden, es gibt jedoch solche, die dabei konstitutionelle Veränderungen erleiden.

Die quantitative Bestimmung der Sterine kann einmal als spektrophotometrische oder kolorimetrische Auswertung der für den qualitativen Nachweis benutzten Farbreaktionen erfolgen, weiterhin als gravimetrische Bestimmung mittels Digitonin (144) oder titrimetrisch nach v. SZENT-GYÖRGI. Dieses titrimetrische Verfahren beruht auf der Oxydation des Sterindigitonids mit Chromsäure.

IV) Eigene Untersuchungen

H a u p t t e i l

A) Orientierende Voruntersuchungen an Extrakten aus den getrockneten Früchten von *Serenoa repens* (Bartr.) Small

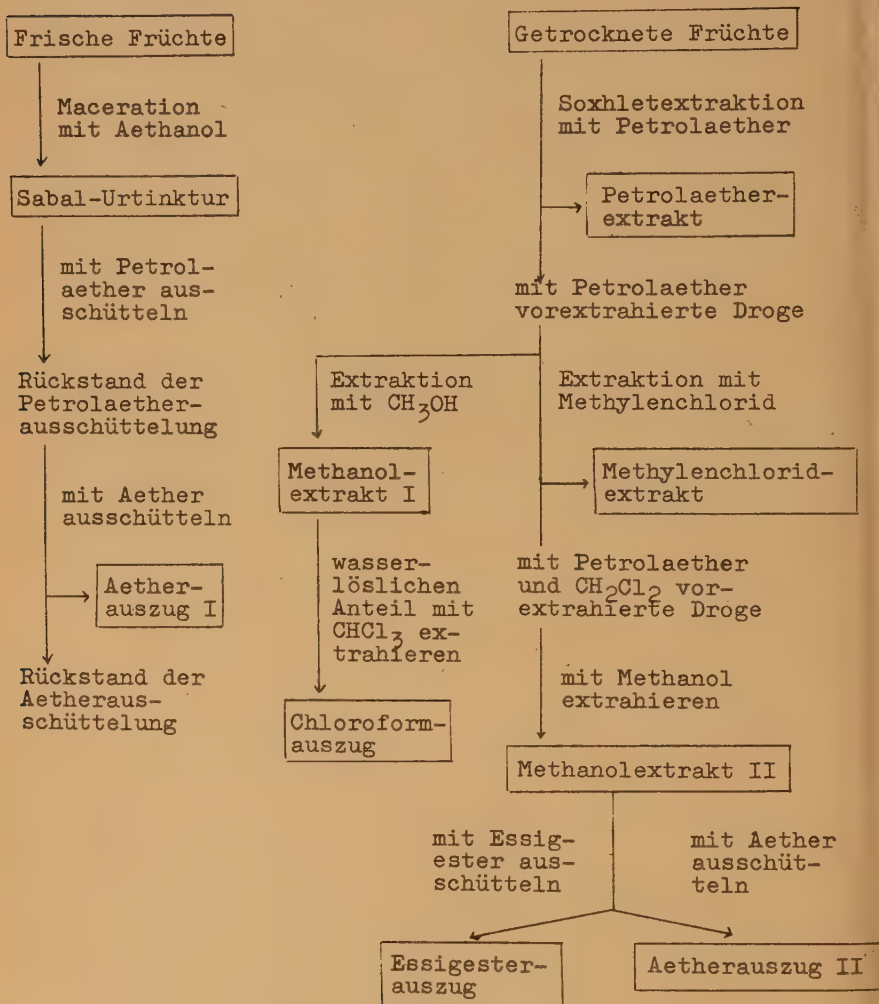
Zu Voruntersuchungen wurden die getrockneten Früchte am Soxhlet erschöpfend mit Petrolaether vorextrahiert. Die mit Petrolaether vorextrahierten Früchte wurden dann entweder sofort der Soxhletextraktion mit Methanol unterworfen oder nacheinander mit Methylenchlorid und Methanol am Soxhlet extrahiert.

Aus den einzelnen Extrakten wurden je nach Art der Voruntersuchungen mit verschiedenen Lösungsmitteln angereicherte Extraktfraktionen isoliert.

Ferner verwendeten wir ein Alkoholmacerat der frischen Beerenfrüchte von *Serenoa repens* (Bartr.) Small (= handelsübliche Urtinktur "Sabal serrulatum") und angereicherte Fraktionen aus diesem Macerat zu Voruntersuchungen.

1) Extrakte aus den Früchten von *Serenoa repens*
(Bartr.) Small zu Voruntersuchungen

Schema 4:



(2) Dünnschichtchromatographische Prüfung auf Flavonoide

Die orientierenden Voruntersuchungen auf das Vorkommen von Flavonoiden wurden nach einer Vorschrift von NEU (146) folgendermaßen vorgenommen: ein Methanol-extrakt aus den getrockneten, mit Petroläther vorextrahierten Früchten wurde mit kaltem Wasser versetzt. Dabei fielen größere Mengen eines bräunlichen Niederschlages aus. Das Fällungsprodukt wurde abgetrennt, in viel heißem Wasser aufgenommen und das Gemisch nach dem Erkalten mit Essigester ausgeschüttelt.

Der Essigesterauszug wurde dünnschichtchromatographisch (Bedingungen siehe Versuchsteil Seite 83) auf Flavonoide geprüft. In den unbehandelten Chromatogrammen fielen drei im langwelligen UV-Licht blau fluoreszierende Substanzen auf, die sich nach dem Besprühen mit Naturostoffreagenz A (Diphenylborsäureaminoäthylester-Komplex) nach NEU deutlich gelb anfärbten. Diese Verbindungen, bei denen es sich um Flavonoide handeln könnte, wurden nach abnehmendem R_f -Wert geordnet, als Verbindungen F_1 , F_2 und F_3 bezeichnet. Nun wurde der Extrakt mit Säure hydrolysiert; im Hydrolysat war nur noch F_3 nachzuweisen. Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei den Verbindungen F_1 und F_2 um Glykoside des Aglykons F_3 handelt.

Im Rahmen der Voruntersuchungen interessierte zunächst nur, ob Isoflavone im Alkoholextrakt aus den getrockneten Früchten nachzuweisen sind, d.h. ob der Verbindung F_3 eine Isoflavonstruktur zuzuordnen ist. Flavonoide haben charakteristische Absorptionsspektren im ultravioletten Bereich, so daß schon ein Vergleich der UV-Absorptionsspektren eine gute Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Flavonen und Isoflavonen bietet. Die UV-Spektren von Isoflavonen haben in der Regel zwei Absorptionsmaxima in den folgenden Bereichen: Bande 1 bei 270 nm und Bande 2 bei 290 - 330 nm. Demgegenüber zeigen die Flavone in der Regel Absorption im Bereich

von 260 - 280 nm und 340 - 370 nm. Die kurzwellige Bande der Isoflavone ist gewöhnlich intensiver als die entsprechende Bande der Flavone. Die langwellige Bande ist von besonderer diagnostischer Bedeutung, da sie bei Isoflavonen hypsochrom verschoben und von wesentlich geringerer Intensität ist. Isoflavanone haben maximale UV-Absorption bei 270 nm und 310 nm, der Unterschied zu den Isoflavonen ist hier also gering (147).

Proben des Essigester-auszuges wurden dünnschicht-chromatographisch an Polyamid/Cellulose aufgetrennt, die Zonen mit der Verbindung F_3 vom Adsorbens mit Methanol eluiert und die UV-Absorption der Lösung im ultravioletten Bereich gemessen. Das mit dem Naturstoff-reagenz gut nachweisbare Flavonoid F_3 hatte Absorptions-banden geringer Intensität, die höchstens die erste Aus-sage bestätigten, daß es sich um ein Flavonoid handelt. Da die untersuchte Lösung nur sehr geringe Mengen der Verbindung F_3 enthielt, konnte das Absorptionsspektrum nicht besonders genau bestimmt werden. Die Genauigkeit der Bestimmung reichte jedoch aus, um zu erkennen, daß es sich nicht um ein Isoflavon handeln kann. Das Spek-trum zeigte ein ausgeprägtes Maximum bei 270 nm und ein weiteres bei 340 nm, während im Bereich von 310 nm kein Maximum festzustellen war.

Zusammenfassung:

Im Methanolextrakt der getrockneten Früchte von *Serenoa repens* (Bartr.) Small konnten dünnschicht-chromatographisch 3 Flavonoide nachgewiesen werden, davon ist eine Verbindung offensichtlich ein Aglykon und die beiden anderen sind wahrscheinlich Glykoside dieses Aglykons. Durch mikropraeparative Isolierung und Bestimmung des UV-Spektrums wurde das Vorliegen eines Isoflavons ausgeschlossen.

3) Prüfung auf Leucoanthocyane

a) Literaturübersicht

Es ist bekannt, daß bei den Palmen Gerbstoffzellen und Gerbstoffschläuche sehr verbreitet sind. Ihr Inhalt ist in getrocknetem Material braun gefärbt, in frischem Material farblos und gibt die Myriophyllin-Reaktion mit Vanillin-Salzsäure. HEGNAUER (148) vermutet daher, daß sie Leucoanthocyane oder Catechinderivate enthalten. Tatsächlich wiesen ROBINSON und ROBINSON (149) Leucoanthocyane in den Samen und im Stamm der Dattelpalme nach. Auch *Serenoa repens* liefert einen Gerbstoffextrakt, der technisch gut verwertbar ist: TRIMBLE (150) fand im Stamm 5,48% und in der Wurzel 7,58% Gerbstoffe. Es ist folglich nicht auszuschließen, daß in den Früchten von *Serenoa repens* Leucoanthocyane vorkommen. BATE-SMITH (151) zeigte den Unterschied zwischen Catechinen und Leucoanthocyanen, der darin besteht, daß nur die Leucoanthocyane beim Behandeln mit heißer Mineralsäure eine rote Färbung geben.

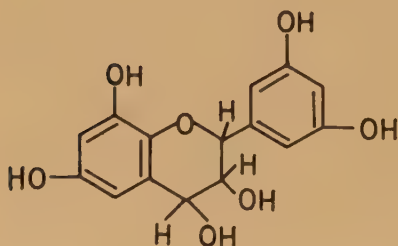
Die Stoffgruppe der Leucoanthocyane ist erst eingehender untersucht worden, seit ROSENHEIM (152) ein weißes amorphes Pulver mit Glykosidstruktur aus unreifen Weintrauben isolierte. Er überführte diese Substanz durch Behandeln mit Salzsäure in ein Anthocyanidin und bezeichnete die isolierte Substanz als Leucoanthocyan. ROBINSON und ROBINSON (149) unterteilten die Leucoanthocyane in drei Gruppen:

- 1) solche, die in Wasser und den üblichen Lösungsmitteln unlöslich sind oder nur kolloidale Lösungen geben,
- 2) solche, die einigermaßen wasserlöslich sind und nicht mit Essigester auszuschütteln sind und
- 3) solche, die aus wässriger Lösung mit Essigester ausgeschüttelt werden können.

In die erste Gruppe sind die durch Kondensation entstandenen polymeren Verbindungen einzuordnen. Die zweite Gruppe bilden einfache Glykoside oder Diglykoside, während

die zur dritten Gruppe gehörenden Verbindungen zuckerfrei sind (Leucoanthocyanidine). Die Bezeichnung Leucoanthocyanidin ist etwas unglücklich gewählt worden in der Annahme, daß die Leucoanthocyane Glykoside der Pseudobasen der korrespondierenden Anthocyane sind.

Neuere Untersuchungen über die Struktur der Leucoanthocyane sprechen dafür, daß es Derivate des Flavan-3,4-diols sind. KING und BOTTOMLY (133) isolierten aus Acacia melanoxylon das 3,4,7,8,3',4'-Hexahydroxyflavan Melacacidin. Diese Verbindung vereinigt die Eigenschaften



Melacacidin

ten der Leucoanthocyanidine und Phlobotannine: es zeigt sich wie bei den Catechinen eine Neigung zur Phlobaphenbildung. Unter dem Einfluß von Mineralsäuren oder auch schon durch das Erhitzen wässriger Lösungen wandelt es sich ausgesprochen leicht in amorphe Gerbstoffe um, die zuerst farblos und wasserlöslich sind,

sich dann jedoch langsam verfärben und unlösliche Gerbstoffe bilden. Das Melacacidin liefert außerdem beim Erhitzen mit Mineralsäure in einem in den Einzelheiten nicht geklärten Reaktionsablauf auch geringe Mengen des entsprechenden Anthocyanidins. In diesem Sinne ist die Vermutung von BATE-SMITH und SWAIN zu verstehen, wonach die Leucoanthocyane chemisch mit den Catechinen verwandt sein müssen, nämlich, daß beide kondensierte Gerbstoffe bilden. KING und CLARK-LEWIS (154) synthetisierten den Melacacidintetramethyläther, der dann in das korrespondierende Anthocyanidin überführt wurde.

b) Eigene Untersuchungen

Getrocknetes Pericarp der Früchte von *Serenoa repens* (mit Petroläther oder Petroläther und Methanol vorextrahiert) wurde mit methanolischer Salzsäure zum Sieden erhitzt, dabei bildete sich ein roter Farbstoff, der sich nach dem Verdünnen der Lösung mit Wasser mit Amylalkohol ausschütteln ließ. In dieser Lösung war der Farbstoff nur vorübergehend beständig. Beim Einengen der salzsauren Methanollösung trat eine braunschwarze Fällung auf, die in Wasser und Alkohol kaum löslich war und die Myriophyllin-Reaktion gab. Beide Reaktionen sind relativ spezifisch, also handelt es sich vermutlich um ein Leucoanthocyan. Die Farbreaktion lässt sich leicht durchführen. Arzneizubereitungen, wie beispielsweise die Urtinktur, geben die rote Farbreaktion mit alkoholischer Salzsäure ebenfalls, man könnte daher diese Reaktion mit zur Identitätsprüfung solcher Zubereitungen heranziehen.

4) Prüfung auf Anthranilsäure

a) Nachweis der Anthranilsäure

Zu Voruntersuchungen wurden ein Ätherauszug aus dem Methanolextrakt der Früchte, ein Ätherauszug aus der Sabal-Urtinktur und die Urtinktur (18) papierchromatographisch und dünnenschichtchromatographisch an Cellulose geprüft. Die Chromatogramme wurden im kurzwelligen und langwelligen UV-Licht beobachtet, anschließend mit einer Vanillin-Salzsäure-Lösung und mit Prochazka-Reagenz besprüht und am Tageslicht und im UV-Licht beobachtet. In den Chromatogrammen wurde eine Substanz beobachtet, die mit authentischer Anthranilsäure im R_f -Wert übereinstimmte, mit den Sprühreagenzien eine gleiche Anfärbereaktion gab und unbehandelt im langwelligen UV-Licht ebenso intensiv blau fluoreszierte. Anthranilsäure lässt sich im Papierchromatogramm durch Behandeln mit Vanillin-Salzsäure gelb anfärben, im Cellulose-

Dünnschichtchromatogramm färbt sie sich mit dem Formaldehyd-Salzsäure-Reagenz (158) schwach hellbeige.

- b) Mikropraeparative Isolierung der Anthranilsäure
α) aus der Urtinktur

Zur praeparativen Isolierung der Substanz aus der Urtinktur, die in den Papier- und Dünnschichtchromatogrammen im Rf-Wert und den Anfärbereaktionen mit der Anthranilsäure übereinstimmte, wurde zunächst ein angereicherter Extrakt hergestellt. Dazu wurde der Verdampfungsrückstand der Urtinktur mit Wasser versetzt und die Lösung durch Ausschütteln mit Petroläther von den lipophilen Anteilen befreit. Der wässrige Rückstand der Petrolätherausschüttelung wurde beim pH 4,6 mit Chloroform extrahiert. Aus dem Trockenrückstand dieser Chloroformlösung erhielt man bei 100° im Vakuum ein Sublimationsprodukt, das jedoch nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte, es reichte eben zur dünnschichtchromatographischen Prüfung aus.

- β) aus dem Methanolextrakt

Zur weiteren Isolierung eines mit Anthranilsäure angereicherten Extraktes wurden Rückstände von der Gewinnung des unverseifbaren Anteiles aus dem Methanolextrakt aufgearbeitet. Diese überwiegend wässrigen Lösungen wurden, nachdem die Vorversuche gezeigt hatten, daß die Anthranilsäure aus wässrigen Lösungen am besten beim pH 4,6 in eine Chloroformphase überführt werden kann, beim pH 4,6 mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Anthranilsäure ließ sich aus dieser Chloroformphase im Gegensatz zu einem Teil der Begleitstoffe leicht mit 1n-Salzsäure ausschütteln und anschließend wieder in eine frische Chloroformphase überführen. Der Verdampfungsrückstand dieses Chloroformauszuges wurde an Cellulose säulenchromatographisch unter Verwendung von

2%iger Essigsäure als Elutionsmittel aufgetrennt.

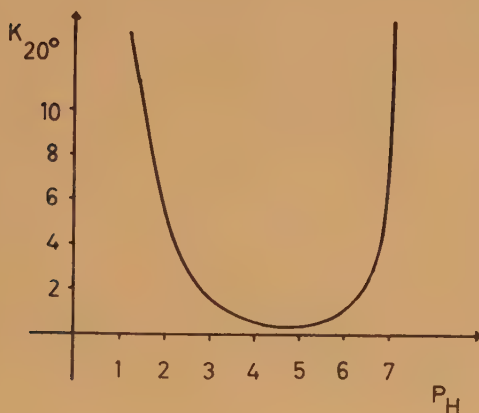


Abbildung 5: pH-Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten (K_{20°) der Anthranilsäure im System Phosphatpuffer nach Sörensen/ Chloroform

Aus dem Eluat der an der Säule im UV-Licht intensiv blau fluoreszierenden Zone wurde durch Ausschütteln mit Chloroform eine mit Anthranilsäure angereicherte Extraktlösung gewonnen. Dieses angereicherte Substanzgemisch wurde in der Mikro-Verteilungsbatterie nach Hecker (156) im System: Chloroform/ 0,15 mol Phosphatpufferlösung nach Sörensen einem 25-stufigen Grundprozeß einer Craig-Verteilung unterworfen. Im gelbbraunen Trockenrückstand der Phasen der Elemente 11 bis 25 ließ sich unter den genannten Bedingungen chromatographisch reine Anthranilsäure nachweisen. Kristallisationsversuche dieses Trockenrückstandes aus Cyclohexan lieferten eine mikrokristalline Masse mit dem Schmelzbereich $71-120^\circ$, die nach Kofler (157) durch Absaugen der eutektischen Schmelze gereinigt wurde und dann einen Schmelzbereich von $138-146^\circ$ hatte. Ein Mischschmelzpunkt der so gereinigten Anthranilsäure mit authentischer Vergleichssubstanz ergab keine Depression. In der papier-

chromatographischen und dünnschichtchromatographischen Prüfung an Cellulose stimmte die isolierte Verbindung im Rf-Wert und den Anfärbereaktionen mit der authentischen Anthranilsäure überein. Wir hielten daher die isolierte Verbindung für mit der Anthranilsäure identisch.

5) Prüfung auf Sterine

a) Adsorptionschromatographie eines Petrolaetherextraktes an Kieselgel

Nach KAUFMANN (164) lässt sich ein Lipidgemisch an Kieselsäure säulenchromatographisch mit Petrolaether, Trichloraethylen und Diaethylaether in den Kohlenwasserstoffanteil, die Cholesterinester und schließlich Triglyceride, Cholesterin und die Fettsäuren in der Aetherfraktion auftrennen.

In eigenen Untersuchungen wurde diese Methode etwas variiert: ein Petrolaetherextrakt aus den Früchten von *Serenoa repens* wurde an Kieselgel chromatographiert. Es wurde nacheinander mit Hexan, Petrolaether, Benzol, Chloroform und Aceton eluiert. Auf diese Weise war die Hauptmenge, nämlich die Fettfraktion des Extraktes, gut aufzutrennen. Im Benzoleluat waren neben nicht identifizierten Substanzen dünnschichtchromatographisch zwei Substanzen nachzuweisen, die eine positive Liebermann-Burchard-Reaktion gaben.

b) Chromatographie eines Methanolextraktes an Aluminiumoxyd und Kieselgel

Ein Essigsterauszug aus dem Methanolextrakt (Droge mit Petrolaether und Methylenchlorid vorextrahiert) wurde säulenchromatographisch an Aluminiumoxyd neutral der Aktivitätsstufe IV in Essigester aufgetrennt. Von den zahlreichen verschiedenfarbigen Zonen, die sich an der Säule ausbildeten, erschien die erste am Tageslicht gelb-

grün. Der Verdampfungsrückstand des Eluats dieser Zone wurde nun an einer Kieselgelsäule chromatographiert. Die Säule wurde zuerst mit Benzol entwickelt und eluiert; nach der deutlichen Auftrennung des Extraktes in zahlreiche verschiedenfarbige Zonen wurde weiter mit Benzol-Chloroform-Mischungen, Chloroform und Essigester eluiert. Das Eluat wurde gleichmäßig fraktioniert, die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch an Kieselgel auf Inhaltsstoffe geprüft, die eine positive Liebermann-Burchard-Reaktion gaben. Eine Substanz mit deutlich positiver Anfärbereaktion war nur in einer Fraktion des Chloroformeluats nachzuweisen. Diese Substanz wurde in der Folge mit M_1 bezeichnet. Der Verdampfungsrückstand dieser Fraktion wurde zur Feintrennung an einer Kieselgelsäule mit Chloroform chromatographiert. An der Säule waren am Tageslicht fünf deutlich getrennt Zonen zu erkennen. Aus dem Eluat der vierten Zone konnte nach eintägigem Stehen M_1 mikrokristallin erhalten werden, nach dem Umkristallisieren aus absolutem Aethanol schmolz sie bei $139,5 - 140^\circ$. Alle weiteren Fraktionen, die bei der ersten säulenchromatographischen Auftrennung des Essigesterauszuges aus dem Methanolextrakt anfielen, wurden an Kieselgel und teilweise wiederholt an Aluminiumoxyd chromatographiert. Die Trennungen lieferten ausnahmslos Mischfraktionen verschiedener Substanzen, von denen keine bei der dc-Prüfung eine positive Liebermann-Burchard-Reaktion gab und auch keine Kristallisationstendenz zeigte.

Nach Abschluß dieser Vorversuche zur säulenchromatographischen Auftrennung waren zahlenmäßig mehr Substanzen dünnschichtchromatographisch nachzuweisen als vor der Trennung, eine Zersetzung der Extraktfraktionen während des Chromatographierens muß hier angenommen werden.

B) Untersuchung der unverseifbaren Anteile von Drogenextrakten auf Steroide

Im Rahmen eingehender Untersuchungen sollte nun die Steroidfraktion auf solche Substanzen geprüft werden, die möglicherweise für die pharmakologische Wirksamkeit der Auszüge aus den Früchten von *Serenoa repens* im Sinne der therapeutischen Verwendung verantwortlich gemacht werden können.

1) Extraktion des Drogenmaterials und Gewinnung der unverseifbaren Anteile

In pflanzlichem Material findet man die Sterine in der Lipoidfraktion mit Fetten und Lecithinen vergesellschaftet vor, also in Extrakten, die man mit typischen Fettlösungsmitteln wie Petroläther, Diaethylaether und Chloroform erhält. Nur stark polare Verbindungen sind in alkoholischen Auszügen nachzuweisen. Nach den Vorproben befinden sich sowohl in der Lipoidfraktion als auch im Alkoholauszug Liebermann-Burchard-positive Verbindungen. Die Droge oder teilweise nur das Epi- und Mesocarp der getrockneten Früchte wurden daher systematisch mit Petroläther, Methylenchlorid und Methanol extrahiert. Außerdem gelangte ein mit 90 %igem Aethanol hergestelltes Macerat der frischen Früchte von *Serenoa repens* (= handelsübliche Urtinktur) zur Untersuchung. Die gewonnenen Extrakte wurden auf Steroide geprüft. Dazu wurde die Gesamtmenge des Unverseifbaren durch Ausschütteln in Petroläther (Petrolätherextrakt) oder Diaethylaether (Methylenchloridextrakt, Methanolextrakt, Urtinktur) aufgenommen. Die Ausschüttelungen wurden im Vakuum zur Trockne gebracht: die Sterine finden sich im unverseifbaren Anteil der Extrakte in der Regel vergesellschaftet mit Wachsalkoholen, Kohlenwasserstoffen und anderen Neutralstoffen.

2) Auftrennung der unverseifbaren Anteile

2,1) Petrolaetherextrakt

a) Dünnschichtchromatographische Prüfung

Der unverseifbare Anteil des Petrolaetherextraktes wurde dc-geprüft: in den Chromatogrammen waren sechs Substanzen zu beobachten, die eine deutliche Anfärbe-reaktion mit Phosphorsäure gaben. Sie wurden nach steigendem Rf-Wert mit α_1 bis α_6 bezeichnet.

b) Isolierung der Verbindungen α_1 und Pe_1

Nachdem dünn-schichtchromatographisch eine gute Trennung dieser Substanzen gegeben war, wurde eine Probe des Unverseifbaren an einer Kieselgelsäule unter Verwendung von Petrolaether, Benzol, Chloroform, Diaethylaether, Essigester und Aceton als Elutionsmittel chromatographiert. Das Eluat wurde fraktioniert und wieder an Kieselgel dc-geprüft: es zeigte sich, daß eine gute Vortrennung erreicht wurde.

Die Substanzen α_1 und α_6 lagen in angereicherten Fraktionen vor, konnten jedoch aus ihnen nicht kristallin erhalten werden. Die α_6 -haltigen Fraktionen enthielten zu wenig Substanz um sie weiter aufzuarbeiten. Aus α_1 -haltigen Fraktionen dieser säulenchromatographischen Trennung kristallisierte beim Stehenlassen eine Verbindung aus, die bei der dc-Prüfung nicht zu beobachten war. Diese aus dem Petrolaetherextrakt stammende Verbindung wurde mit Pe_1 bezeichnet, sie hatte den Fp: $82-83^\circ$. Der Verdampfungsrückstand des Filtrates solcher Fraktionen wurde wiederholt an Kieselgelsäulen chromatographiert. Als Elutionsmittel dienten dabei Petrolaether, Benzol, Chloroform, Essigester und Aceton. Die Trennungen lieferten stets Mischfraktionen mit zwei bis drei Komponenten, von denen einzig die Fraktionen, die die mit α_1 bezeichnete Verbindung enthielten, Kristallisationstendenz zeigten. Auf diese Weise konnte aus dem Essigestereluat

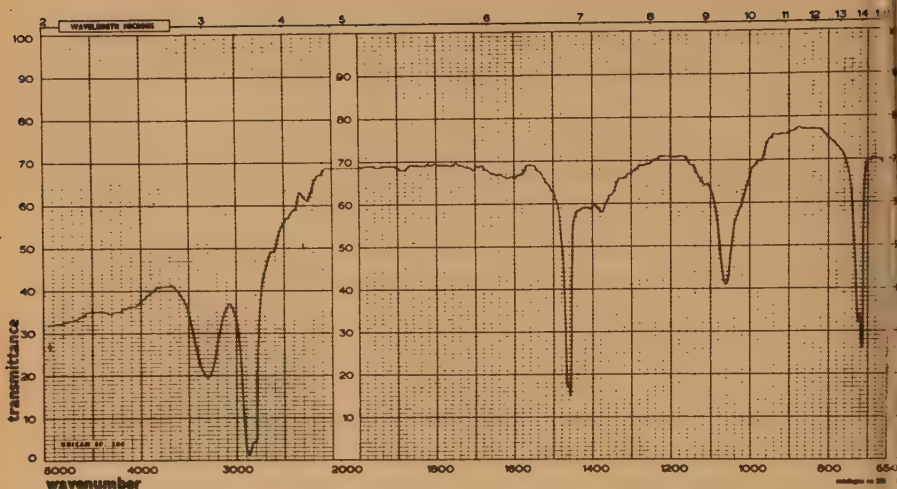
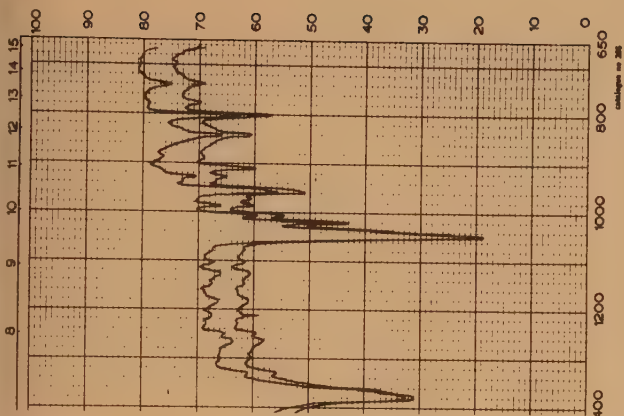


Abbildung 6: IR-Absorptionsspektrum der Verbindung Pe_1 ($c = 2 \text{ mg } Pe_1 / 200 \text{ mg KBr}$)

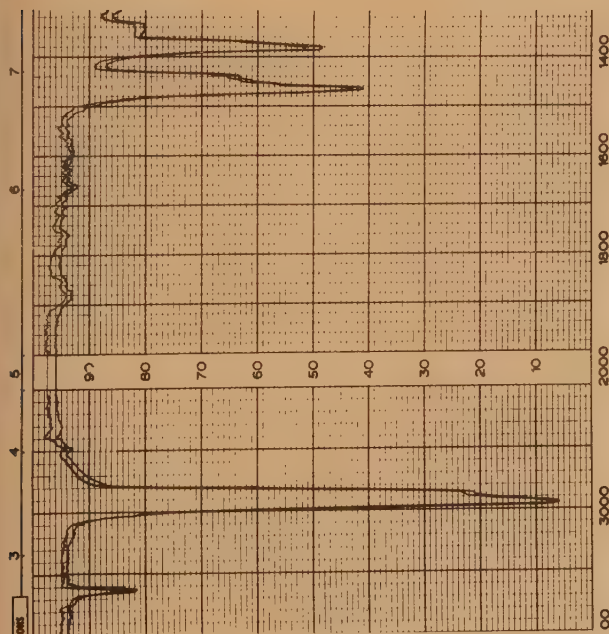
α_1 mit dem Fp: 137-138 (aus Diaethylaether umkristallisiert) rein kristallin erhalten werden.

b) Identifizierung der Verbindung α_1 als β -Sitosterin

Authentisches β -Sitosterin wurde nunmehr mit reinem α_1 in verschiedenen Systemen chromatographiert. Beide stimmten bei der chromatographischen Prüfung an Kieselgel und bei der pc-Prüfung im Veretilungssystem nach Michalec im R_f -Wert und in der Anfärbereaktion mit verschiedenen Sprühreagentien mit dem authentischen β -Sitosterin überein. Die eindeutige Identifizierung erfolgte durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, IR-Spektrum und spezifische Drehung. Die im Verlauf der Voruntersuchungen isolierte Verbindung M_1 (siehe Seite 63) erwies sich ebenfalls identisch mit dem β -Sitosterin.



a)



b)

Abbildung 7: IR-Absorptionsspektrum der Verbindungen α_1 und β -Sitosterin

a) Bereich: 650 - 1400 cm^{-1} in Schwefelkohlenstoff

obere Kurve: α_1 ; untere Kurve: β -Sitosterin

b) Bereich: 1300 - 4000 cm^{-1} in Tetrachloraethylen

obere Kurve: α_1 ; untere Kurve: β -Sitosterin

($c = 10 \text{ mg} / 1 \text{ ml}$)

2,2) Methylenchloridextrakt

a) Dünnschichtchromatographie an Kieselgel

Bei der dc-Prüfung des unverseifbaren Anteiles aus dem Methylenchloridextrakt an Kieselgel fielen fünf Verbindungen besonders durch eine nach Behandlung mit Phosphorsäure am Tageslicht intensive Färbung und im langwelligen UV-Licht kräftige Fluoreszenz auf. Anfärreaktionen der beobachteten Art und Intensität sind für Steroide durchaus möglich. Die lipophilste der fünf Verbindungen stimmte im chromatographischen Verhalten mit dem α_1 des Petrolätherextraktes überein. Die restlichen vier Verbindungen wurden nach abnehmendem Rf-Wert weiter mit β_1 bis β_4 bezeichnet.

b) Versuche zur Isolierung definierter Substanzen und Anreicherung von β_2

Eine Probe des Unverseifbaren aus dem Methylenchloridextrakt wurde an Kieselgel säulenchromatographisch unter Verwendung von Benzol, Chloroform, Aether, Essigester, Aceton und Aethanol als Elutionsmittel aufgetrennt. Das Eluat wurde fraktioniert und dc-geprüft. Im Aether/Essigester-Eluat war die Verbindung β_2 nachzuweisen, die sich nach dem Besprühen mit Phosphorsäure durch eine im langwelligen UV-Licht besonders intensive gelbe Fluoreszenz auszeichnete und am Tageslicht gelbbrot angefärbt war. Die gleichen Farbreaktionen gibt das Oestradiol, das jedoch einen anderen Rf-Wert besitzt. Der Verdampfungsrückstand der Fraktionen dieser groben Vortrennung, die vor allem die Verbindung β_2 enthielten, wurden an einer Kieselgelsäule in Diaethyläther chromatographiert. Nachdem eine deutliche Zonenbildung eingetreten war, wurde mit Essigester eluiert. Das Eluat wurde fraktioniert und dc-geprüft: die Fraktionen 2 und 3 enthielten α_1 . In den Fraktionen 3 bis 6 war überwiegend die Substanz β_2 enthalten (= α_1). Eine Probe

dieser Fraktion A_1 wurde an einer Kieselgelsäule mit Chloroform und Chloroform-Essigester-Mischungen chromatographiert. Nach Abschluß des Versuches zeigten die einzelnen Fraktionen des Eluats bei der dc-Prüfung Flecke, die im zur Trennung gelangten Gemisch unter gleichen Bedingungen nicht nachzuweisen waren. Eine wenigstens teilweise Zersetzung an dem Adsorbens kann daher hier nicht ausgeschlossen werden - eine alleinige Zersetzung bei der dc-Prüfung ist unwahrscheinlich. Einige Fraktionen des Chloroform-Essigester-Eluats schienen unter den genannten Bedingungen chromatographisch reines B_2 zu enthalten, das jedoch mit den üblichen Lösungsmitteln nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Ein Probechromatogramm wurde mit Schwefelsäure besprüht und 25 Minuten lang auf 130° erhitzt, dabei zeigte sich, daß in den vermeintlich reinen Fraktionen ein hoher Anteil zweier lipophilerer Substanzen enthalten war.

Ein Teil des mit der Verbindung B_2 angereicherten Extraktes A_1 wurde in einem System aus Isooctan, Methylisobutylketon, Aethanol und Wasser multiplikativ verteilt. An einen Grundprozeß einer einfachen Craig-Verteilung schloß sich ein Nachfraktionieren mit einphasiger Entnahme der Oberphase an. Nach dieser Auftrennung war die Verbindung B_2 in den Elementen 1 bis 8 angereichert enthalten, konnte jedoch mit den üblichen Lösungsmitteln nicht zur Kristallisation gebracht werden.

c) Versuch zur Isolierung von B_2 durch multiplikative Verteilung

Nachdem bei der Probeverteilung eines mit B_2 angereicherten Extraktes Zersetzungserscheinungen in geringerem Umfange aufgetreten waren, wurden nunmehr 340 mg des unverseifbaren Anteiles aus dem Methylenchloridextrakt direkt im Lösungsmittelsystem: Hexan / Essigester / Aethanol / Wasser multiplikativ verteilt.

In den Elementen 1 bis 5 war β_2 dünnschichtchromatographisch nachzuweisen, nach dem Einengen der Lösungen im Vakuum erhielt man 70 mg gelbbraun gefärbten harzigen Verdampfungsrückstand.

Dieses angereicherte Substanzgemisch wurde durch zweimalige praeparative Papierchromatographie im System: Benzol/ Methylenchlorid/ Formamid aufgetrennt. Die Zonen mit der Verbindung β_2 wurden eluiert. Das nunmehr erhaltene Eluat mit der Verbindung β_2 wurde an Kieselgel dc-geprüft. Es lag eine angereicherte Fraktion vor, die neben geringen Mengen zweier lipophilerer Substanzen überwiegend β_2 enthielt. Trotzdem konnte β_2 wiederum nicht zur Kristallisation gebracht werden. Lösungen in Chloroform verfärbten sich beim Stehen an der Luft von Gelb nach Gelbbraun. Kristallisationsversuche bei 0° blieben auch ohne Erfolg.

4) Methanolextrakt

a) Dünnschichtchromatographie an Kieselgel

Bei der dc-Prüfung an Kieselgel waren im Unverseifbaren des Methanolextraktes elf Substanzen mit teilweise unterschiedlicher Anfärbereaktion und Fluoreszenz im langwelligen UV-Licht zu beobachten. Sie wurden nach abnehmendem Rf-Wert mit γ_1 bis γ_{10} , mit Ausnahme der hydrophilsten der nachweisbaren Verbindungen, bezeichnet. Letztere stimmte im chromatographischen Verhalten mit dem β_4 aus dem Unverseifbaren des Methylenchloridextraktes überein, die Bezeichnung β_4 wurde daher beibehalten.

b) Versuche zur Isolierung definierter Substanzen

a) durch Säulenchromatographie an Kieselgel

Der chloroformlösliche Anteil des Unverseifbaren wurde an einer Kieselgelsäule mit Chloroform chromatographiert. Die Eluatfraktionen wurden dc-geprüft. Es zeigte sich, daß keine chromatographisch reinen

Fraktionen vorlagen.

Zur weiteren Auftrennung kamen Fraktionen mit den Substanzen γ_8 bzw. γ_6 , die sich mit dem Phosphorsäure-reagenz gelb anfärbten und im langwelligen UV-Licht gelbgrün fluoreszierten.

Die beiden Substanzgemische wurden jeweils einzeln an Kieselgelsäulen mit Chloroform, Aether, Essig-ester, Aceton chromatographiert. Fraktionen, die danach die Verbindungen γ_6 und γ_8 neben geringen Mengen an Begleitstoffen enthielten, konnten mit den üblichen Lösungsmitteln nicht zur Kristallisation gebracht werden: man erhielt öelig harzige Produkte.

B) durch multiplikative Verteilung

Zur möglichen Isolierung der Substanzen γ_4 , γ_6 und γ_8 aus dem Unverseifbaren des Methanolextraktes, die adsorptionschromatographisch nicht isoliert werden konnten, wurde eine grobe Auftrennung mittels multiplikativer Verteilung versucht. Dazu wurde das Unverseifbare in einem Tetrachlorkohlenstoff/ Chloroform/ Aethanol/ Wasser-System einem 22-stufigen Grundprozeß einer Craig-Verteilung und anschließendem Nachfraktionieren mit einphasiger Entnahme der Unterphase unterworfen. Der Erfolg der Verteilung wurde dc-geprüft. Übereinstimmende Fraktionen wurden zusammen im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Verdampfungsrückstand der Lösungen aus den Elementen 7 bis 23 enthielt vor allem den hydrophilen Anteil des Unverseifbaren. Dieses Substanzgemisch sollte mittels wiederholter multiplikativer Verteilung weiter aufgetrennt werden; vor allem enthalten waren die Verbindungen γ_8 und β_4 .

Diese Fraktionen wurden nochmals einem 22-stufigen Grundprozeß der Craig-Verteilung unterworfen und anschließend dc-geprüft. In den Elementen 13 bis 23 war die Verbindung β_4 enthalten. Sie konnte aus einer amylo-alkoholischen Lösung des Verdampfungsrückstandes aus den Elementen zur Kristallisation gebracht werden;

sie hatte einen Schmelzbereich von 291 - 296⁰. Mit dem Phosphorsäurereagenz ließ sich diese Verbindung im Dünnschichtchromatogramm nach Art des Sitosterins anfärben. Aus den Phasen der übrigen Elemente dieses Verteilungsprozesses konnten keine weiteren Substanzen kristallin erhalten werden.

c) Isolierung von B_4 und Identifizierung als β -Sitosterin-D-glukosid

Zur Isolierung der Verbindung B_4 im praeparativen Maßstab wurde das Unverseifbare des Methanolextraktes in einen essigesterlöslichen und einen in kaltem Methanol löslichen Anteil getrennt. Der methanollösliche Anteil enthielt so geringe Mengen an der Verbindung B_4 , daß er verworfen werden konnte. Der Trockenrückstand des Essigester-auszuges wurde wiederholt in verschiedenen Lösungsmittelsystemen multiplikativ verteilt, die Phasen der Elemente wurden dc-geprüft.

Zur ersten groben Auftrennung des Essigester-auszuges reichte ein 19-stufiger Grundprozeß einer Craig-Verteilung in einem Tetrachlorkohlenstoff/ Aethanol/ Wasser-System aus. Danach war B_4 in den Elementen 5 bis 12 angereichert enthalten. Der Trockenrückstand dieser Lösungen wurde in einem Hexan/ Essigester/ Aethanol/ Wasser-System einem 19-stufigen Grundprozeß einer Craig-Verteilung unterworfen: hier war B_4 in den Elementen 13 bis 20 angereichert. Die Phasen dieser Elemente wurden zur Trockne gebracht. In einem letzten 19-stufigen Grundprozeß im System Essigester/ Cyclohexan/ Aethanol/ Wasser ließ sich dieses angereicherte Substanzgemisch so weit auftrennen, daß man aus den Phasen der Elemente 5 bis 8 ein B_4 -Rohprodukt erhielt. Das Rohprodukt wurde aus Amylalkohol und Aethanol/Chloroform umkristallisiert und hatte den Fp: 292-293⁰. Die Acetylverbindung hatte den Fp: 168,5-170⁰.

Die einmal aus Aethanol/Chloroform umkristallisier-

te Verbindung B_4 wurde mit amylalkoholisch-aethanolischer Salzsäure gekocht. Nach dem Abkühlen der Lösung fiel ein farbloser Niederschlag aus. Dieses Verhalten läßt vermuten, daß es sich bei der Verbindung B_4 um ein Glykosid handelt. Das Rohprodukt wurde an einer Kieselgelsäule mit Benzol und Chloroform chromatographiert.

In den ersten Fraktionen des Eluats waren Spuren zweier lipophiler Substanzen dünnschichtchromatographisch nachzuweisen, die mit dem Phosphorsäurereagenz eine wenig spezifische Anfärbereaktion gaben. Aus den Fraktionen 9 bis 12 wurde der wägbare Anteil der chromatographierten Substanz, der mit B_4A bezeichnet wurde, kristallin erhalten. B_4A hatte nach dem Umkristallisieren aus absolutem Aethanol den Fp: $139-140^{\circ}$. Die Verbindung verhält sich bei der dc-Prüfung hinsichtlich Laufhöhe und Anfärbung mit dem Phosphorsäurereagenz wie β -Sitoosterin. Auch der Mischschmelzpunkt mit authentischem β -Sitosterin war nicht erniedrigt.

Die nach dem Abfiltrieren des Aglykons B_4A verbliebene wässrige Lösung wurde mit Di-n-Octylamin neutralisiert. Die neutrale Lösung wurde zum pc-Nachweis des mit B_4Z bezeichneten Zuckeranteiles von B_4 in drei verschiedenen Laufmitteln verwendet. Dabei ließ sich jeweils nur eine Zuckerkomponente B_4Z des Glykosides B_4 nachweisen, die in den Laufmitteln:

I) n-Butanol/ Pyridin/ Wasser = 6/ 4/ 3 (v/v)

II) n-Butanol/ Aethanol/ Wasser/ 28% Ammoniak =
10/ 3/ 5/ 0,25 (v/v)

und III) n-Butanol/ Essigsäure/ Wasser = 4/ 1/ 5 (v/v)
im Rf-Wert mit authentischer Glukose übereinstimmte und mit dem Anilinphthalatsprühareagenz eine gleiche Anfärbereaktion gab.

Nachdem der wesentliche Anteil des Aglykons als β -Sitosterin, der Zuckeranteil des Glykosides als Glukose identifiziert werden konnten, und außerdem das Absorptionsspektrum des B_4 im infraroten Bereich mit den Angaben in der Literatur (155) übereinstimmten, sehen wir die Verbindung B_4 als β -Sitosterin-D-glukosid an.

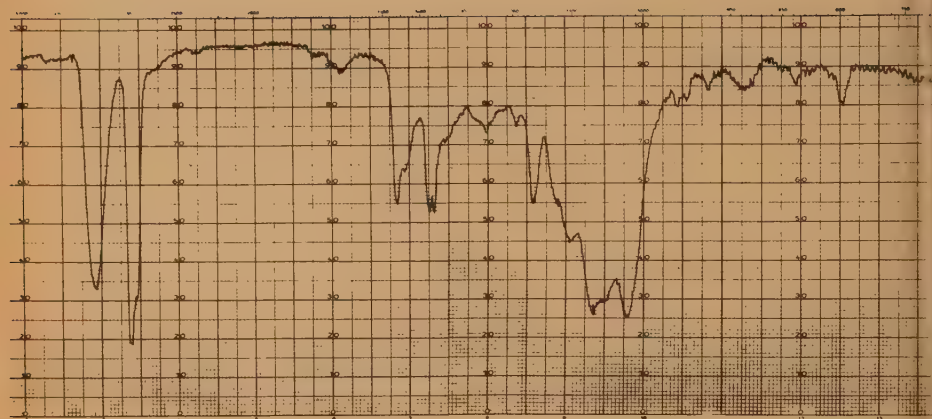


Abbildung 8: IR-Absorptionsspektrum der Verbindung B_4 ($c = 1,09 \text{ mg/ 200 mg KBr}$)

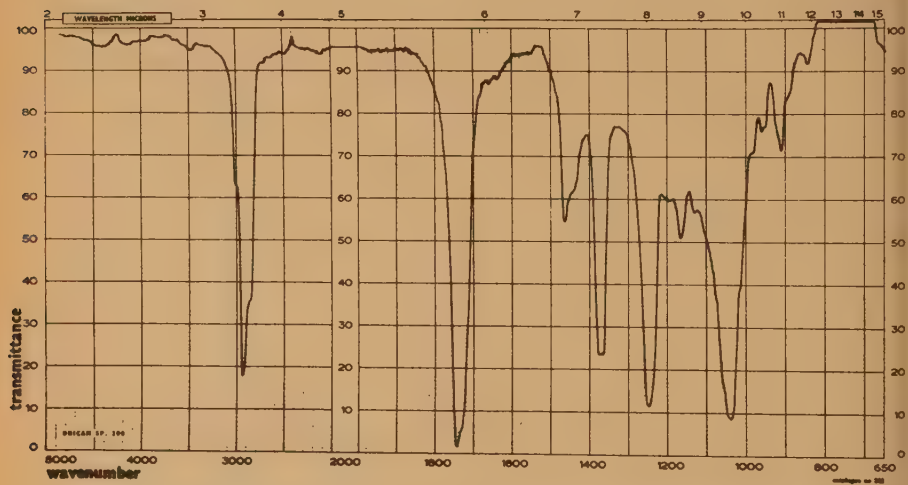


Abbildung 9: IR-Absorptionsspektrum der Acetylverbindung des B_4 ($c = 10 \text{ mg/ 1ml Chloroform}$)

2,4) Untersuchung des unverseifbaren Anteiles aus der Urtinktur

a) Digitoninfällung

Das Unverseifbare der Urtinktur wurde in aethanolischer Lösung mit einer Digitoninlösung versetzt. Das ausgefallene Digitonid wurde mit Pyridin/ Aether wieder gespalten. Der Trockenrückstand der vom Digitonin befreiten Lösung und das Zentrifugat wurden dc-geprüft.

Als Digitonid ließ sich eine Verbindung fällen, die mit dem α_1 des Petrolaetherextraktes (= β -Sito-sterin) identisch war. Im Zentrifugat der Digitoninfällung waren zwei lipophilere Substanzen enthalten, die mit dem Sprühreagenz eine Anfärbereaktion gaben, weiterhin die Verbindung β_2 , die auch im Methylenchloridextrakt nachzuweisen war. Außerdem befand sich in dem Zentrifugat eine sehr hydrophile Substanz, die bei der dc-Prüfung mit dem β_4 des Methylenchloridextraktes übereinstimmte.

b) Multiplikative Verteilung des Zentrifugates der Digitoninfällung

Der Trockenrückstand des Filtrates der Digitoninfällung wurde in einem Aethanol/ Wasser/ Hexan/ Essigester-System einem Grundprozeß der Craig-Verteilung unterworfen. In den Elementen 1 bis 5 war die Verbindung β_2 angereichert.

Praeparativ papierchromatographische Trennversuche mit diesem β_2 -angereicherten Substanzgemisch lieferten Spuren eines belbbraunen lackartigen Substanzgemisches, aus dem β_2 auch wieder nicht kristallin erhalten werden konnte.

- 3) Quantitative Bestimmung von Sitosterin in den Früchten von *Serenoa repens*
a) Bestimmung des nicht glykosidisch gebundenen Sitosterins

Die zerkleinerte Droge wurde nacheinander mit Petroläther und Methanol am Soxhlet extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit Natriummethylatlösung verseift und die Gesamtmenge des Unverseifbaren in Diaethyläther aufgenommen. Sitosterin wurde aus dem Unverseifbaren als Digitonidgefällt, das Fällungsprodukt mit wenig Chloroform durchgeschüttelt, die Chloroformphase abgetrennt und der Rückstand zentrifugiert. Das Digitonid wurde abgetrennt, getrocknet, dann in Pyridin gelöst, durch Zusatz von Äther zu der Pyridinlösung gespalten und vom ausgefallenen Digitonin abfiltriert. Die Pyridin-Ätherlösung des Sitosterins wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und der Rückstand ausgewogen.

Mit dieser Methode wurde sowohl freies Sitosterin als auch möglicherweise als Fettsäureester gebundenes erfaßt. Zu Einzelbestimmungen verwendeten wir Extrakte aus 50,0 g Drogenmaterial und erhielten als Mittelwert von vier Bestimmungen einen Gehalt von $18,9 \pm 0,4$ mg % Sitosterin, bezogen auf die Droge.

- b) Bestimmung des β -Sitosterin-glukosides

Das zerkleinerte Drogenmaterial (je 50,0 g) wurde nacheinander mit Petroläther und Methanol extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum eingeeengt. In diesen Extrakten wurde das Glukosid durch einstündiges Kochen mit aethanolisch/amyalkoholischer Salzsäure hydrolysiert, anschließend wurde das Reaktionsprodukt in Äther aufgenommen. Der Trockenrückstand des Ätherauszuges wurde mit Natriummethylatlösung gekocht und die Gesamtmenge des Unverseifbaren durch Ausschütteln in Diaethyläther aufgenommen. Das Sitosterin wurde aus dem Unverseifbaren als Digitonid

gefällt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der Bestimmung des freien Sitosterins. Als Mittelwert von sechs Bestimmungen erhielten wir einen Gesamtsitosterin-gehalt von $41,6 \pm 2,8$ mg% bezogen auf die Droge. Aus der Differenz dieser Bestimmung und der Bestimmung des freien Sitosterins ergibt sich für glykosidisch gebundenes Sitosterin ein Mittelwert von 22,7 mg %.

- 4) Quantitative Bestimmung des Sitosterins in der Sabal-Urtinktur
- a) Bestimmung des nicht glykosidisch gebundenen Sitosterins

Der Verdampfungsrückstand der Urtinktur wurde mit Natriummethylatlösung verseift und die Gesamtmenge des Unverseifbaren in Diaethylaether aufgenommen. Das Sitosterin wurde als Digitonid gefällt, das Reaktionsgemisch mit wenig Chloroform durchgeschüttelt und anschließend zentrifugiert. Die Lösung des Digitonids in Pyridin wurde mit Aether versetzt, das Digitonin abgetrennt. Die Pyridin-Aetherlösung des Sitosterins wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt. Als Trockenrückstand wurde Sitosterin ausgewogen, das in der Urtinktur frei oder als Fettsäureester gebunden vorlag. Zu Einzelbestimmungen nahmen wir Proben zu 50,0 g Urtinktur und erhielten als Mittelwert von sieben Bestimmungen $12,7 \pm 0,7$ mg %, bezogen auf die Urtinktur.

- b) Bestimmung des β -Sitosteringlukosides

Der Verdampfungsrückstand der Urtinktur wurde durch einstündiges Kochen mit aethanolisch/ amylalkoholischer Salzsäure hydrolysiert. Das Reaktionsprodukt wurde erschöpfend mit Aether ausgeschüttelt. Der Rückstand des im Vakuum zur Trockne gebrachten Aetherauszuges wurde durch Kochen mit Natriummethylatlösung verseift. Das Unverseifbare wurde durch Ausschütteln in Aether aufge-

nommen und das Sitosterin daraus als Digitonid gefällt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der Bestimmung des freien Sitosterins. Als Mittelwert von fünf Bestimmungen erhielten wir einen Gesamtsitosteringehalt von $22,3 \pm 6$ mg %. Aus der Differenz dieser Bestimmung und der Bestimmung des freien Sitosterins ergibt sich für glykosidisch gebundenes Sitosterin ein Mittelwert von 9,6 mg %, bezogen auf die Urtinktur.

C) Zusammenfassung

1) Aus den getrockneten Früchten von *Serenoa repens* (Bartr.) Small wurden β -Sitosterin (I) und β -Sitosterin-D-glukosid (II) isoliert. Die Isolierung von I gelang durch mehrfache Säulenchromatographie sowohl genuiner Extrakte als auch der unverseifbaren Anteile. II wurde durch mehrfache multiplikative Verteilung des unverseifbaren Anteiles eines Methanolextraktes gewonnen. Die Verbindungen wurden durch Schmelzpunkt und IR-Spektrum (I und II), Mischschmelzpunkt, spezifische Drehung (I) bzw. chromatographischen Nachweis der Glukose und des Aglykons nach Hydrolyse (II) identifiziert. Beide Verbindungen ließen sich in der handelsüblichen Urtinktur *Sabal serrulatum* (18) chromatographisch nachweisen.

2) Es wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung des freien und des Gesamtsitosterins auf der Basis der Digitoninfällung ausgearbeitet. Die Gehaltsbestimmung aus der Droge ergab folgende Mittelwerte:

nicht glykosodisch gebundenes Sitosterin: $18,9 \pm 0,4$ mg%
Gesamtsitosterin: $41,6 \pm 2,8$ mg%.

Die Gehaltsbestimmung aus der Urtinktur ergab folgende Werte:

nicht glykosidisch gebundenes Sitosterin: $12,7 \pm 0,7$ mg%
Gesamtsitosterin: $22,3 \pm 6$ mg%.

3) Weitere Verbindungen, die sich dünnschichtchro-

matographisch hinsichtlich Laufhöhe und Farbreaktion mit verschiedenen Sprühreagenzien wie Steroide verhielten, konnten nachgewiesen werden. Versuche zur Isolierung einiger dieser Verbindungen lieferten keine kristallinen Produkte.

4) Im Methanolextrakt der getrockneten Früchte von *Serenoa repens* konnten dünn-schichtchromatographisch 3 Flavonoide nachgewiesen werden, davon ist eine Verbindung offensichtlich ein Aglykon und die beiden anderen sind wahrscheinlich Glykoside dieses Aglykons. Durch mikropräparative Isolierung und Bestimmung des UV-Spektrums wurde das Vorliegen eines Isoflavons ausgeschlossen.

5) Eine bei der papierchromatographischen Prüfung der Urtinktur durch ihre intensiv blaue Fluoreszenz auffallende Verbindung wurde mikropräparativ isoliert und als Anthranilsäure identifiziert.

6) Kocht man die Droge oder den Verdampfungsrückstand der Urtinktur mit methanolischer Salzsäure, dann tritt eine kräftige Rotfärbung auf, die sich nach dem Verdünnen mit Wasser mit Amylalkohol ausschütteln läßt. Diese Reaktion ist für Leucoanthocyane relativ spezifisch und kann zur Identitätsprüfung von Zubereitungen aus den *Serenoa*-Früchten herangezogen werden.

D) Diskussion

Aromatische Steroide vom Typ der im Tierorganismus vorkommenden Oestrogene konnten nicht einwandfrei nachgewiesen werden. Auch das Vorkommen von oestrogen wirksamen Isoflavonen wurde ausgeschlossen. Auffallend ist, daß ein relativ hoher Anteil an β -Sitosterin in freier und glykosidisch gebundener Form in der Droge enthalten ist. Da nach HASSAN und ELGHAMRY (54;55;111)

auch für β -Sitosterin oestrogene Wirkungen im Tierexperiment nachgewiesen sind, könnte diese Verbindung möglicherweise an der Drogenwirkung beteiligt sein. Man könnte daran denken, daß eine eventuell vorhandene Oestrogenwirkung durch das Vorkommen von reichlich freien Fettsäuren, wie es von GRIEBEL und BARNES (13) sowie SHERMAN und BRIGGS (15) in *Serenoa repens* nachgewiesen wurde, verstärkt wird. Ein ähnlicher Effekt wurde für das Testosteron und andere Androgene beschrieben (165). Weitere Untersuchungen, insbesondere auch pharmakologische Studien wären wünschenswert.

Experimenteller Teil

A) Allgemeines

Die getrockneten Früchte von *Serenoa repens* (Bartr.) Small, Extrakte aus der Droge und Proben der handelsüblichen Urtinktur "Sabal serrulatum" wurden uns von der Firma Schwabe (Karlsruhe) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Wir möchten uns auch an dieser Stelle nochmals bei der Firma Schwabe, insbesondere Herrn Direktor Scholz für die freundliche Unterstützung herzlich bedanken.

Zur Bereitung der Urtinktur "Sabal serrulatum" nach der Vorschrift des Homöopathischen Arzneibuches (18) werden nach Bestimmung des Saftgehaltes der frischen reifen Beerenfrüchte von *Serenoa repens* auf 1 Gewichtsteil des berechneten Saftes 2 Gewichtsteile Weingeist (90%) zu den frischen Früchten gegeben. Nach Maceration während 8-10 Tagen wird von dem Pflanzenmaterial abgepresst und die erhaltene Essenz filtriert: sie stellt die Urtinktur "Sabal serrulatum" dar.

Zur Papierchromatographie (pc) fand Papier Schleicher und Schüll Nr. 2043 bM Verwendung. Die Chromatogramme wurden ausnahmslos aufsteigend entwickelt.

Zur Dünnschichtchromatographie (dc) wurden Platten im Format 20x20 cm verwendet. Die Platten wurden mit dem Streichgerät nach Stahl (Firma Desaga) beschichtet; die Schichtdicke des Sorptionsmittels Kieselgel G "Merck" betrug etwa 250 μ .

Die zur dc-Prüfung auf Flavonoide verwendeten Polyamid-Celluloseplatten wurden folgendermaßen bereitet: 8,3 g Polyamid und 1,7 g Cellulosepulver wurden in einer Mischung aus 24 ml Chloroform und 36 ml Methanol suspendiert. Mit der Suspension wurden 5 Glasplatten 20x20 cm beschichtet.

Als Standard-Sprühreagenzien wurden gebraucht:

R 1: halbkonzentrierte Phosphorsäurelösung: H_3PO_4
($d=1,71$) / Aq. dest. = 1/1 (v/v)

R 2: 10%ige wässrige Phosphorsäurelösung (10 ml H_3PO_4 (d=1,71) + 90 ml Aq. dest.)

Die Mikroanalysen wurden durchgeführt im Mikroanalytischen Laboratorium Ilse Beetz (Kronach/Ofr.) und im Analytischen Kontroll-Labor der Firma Schering (Berlin)⁺.

Die IR-Spektren wurden im Analytischen Kontroll-Labor der Firma Schering (Berlin)⁺ und mit dem Leitz Unicam IR-Spektrophotometer SP 200 aufgenommen. Zur Messung gelangten KBr-Presslinge und Lösungen in Chloroform, Tetrachloraethylen und Schwefelkohlenstoff.

Die UV-Spektren wurden in Quarzküvetten mit der Schichtdicke 1 cm mit dem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II gemessen.

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte auf einem Kofler-Heiztischmikroskop.

Zur Craig-Verteilung bedienten wir uns einer Verteilungsbatterie nach Hecker, die nach dem Dekantierprinzip arbeitet.

Das Einengen der Lösungen im Vakuum wurde, wenn keine näheren Angaben gemacht werden, am Rotationsverdampfer der Firma Büchi vorgenommen.

Die authentischen Vergleichssubstanzen stellen Handelsprodukte dar:

β -Sitosterin der Firma Roth (Karlsruhe)

Anthranilsäure der Firma Merck

Xylose, Glukose, Rhamnose und Mannose der Firma Merck
Oestron, Oestradiol und Oestriol wurden uns als Vergleichssubstanzen freundlicherweise von der Firma Schering (Berlin) zur Verfügung gestellt, der wir auch an dieser Stelle für die großzügige Unterstützung danken.

B) Voruntersuchungen an Extrakten aus der Droge

1) Prüfung auf Flavonoide

a) Dünnschichtchromatographie an Polyamid/Cellulose

50,0 g Droge (mit Petroläther vorextrahiert) wurden am Soxhlet erschöpfend mit Methanol extrahiert, der Methanolextrakt i.Vak. zur Trockne gebracht. Der zähflüssige Rückstand wurde bis zur quantitativen Fällung des in kaltem Wasser unlöslichen Anteiles mit insgesamt 100 ml Wasser versetzt. Zur besseren Abtrennung des feinen Niederschlages wurde so viel Kieselgur hinzugefügt, daß ein Abfiltrieren möglich wurde. Der Filterkuchen wurde mit Wasser nachgewaschen, dann mit drei Portionen zu je 50 ml kaltem Isopropanol extrahiert. Der Isopropanolauszug wurde i.Vak. zur Trockne gebracht, der Verdampfungsrückstand mit 100 ml heißem Wasser versetzt und nach dem Erkalten die stark getrübbte Lösung mit insgesamt 200 ml Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterlösung wurde auf ein Volumen von ca 10 ml eingengt. Von dieser Stammlösung wurden 10 µl zur dc-Prüfung an Polyamid/Cellulose genommen.

Adsorbens: Polyamid/Cellulose

Laufmittel: Benzol/Methanol/Wasser = 20/70/10 (v/v)

Sprühreagenz: 1%ige Lösung von Diphenylborsäureamino-
äthylester-Komplex in Methanol (g/v)
(=Naturstoffreagenz A nach Neu)

In den unbehandelten Chromatogrammen fielen drei vor der Analysenquarzlampe blau fluoreszierende Substanzen auf, die mit dem Sprühreagenz nach Neu eine deutliche gelbe Anfärbereaktion gaben. Diese unbekannten "Flavonoide" wurden in der Folge nach steigender Polarität geordnet, mit F_1 (Rf-Wert: 0,63), F_2 (Rf-Wert: 0,55) und F_3 (Rf-Wert: 0,18) bezeichnet.

Aus 5 ml Essigesterstammlösung wurde der Essigester abdestilliert, der Rückstand mit 10 ml 12,5%iger äthanolischer Salzsäure gekocht. Das Reaktionsprodukt wurde nach dem Erkalten mit 10 ml Wasser verdünnt und

erschöpfend mit Diaethylaether ausgeschüttelt. Die gesammelten Aetherauszüge wurden auf ein Volumen von ca 2 ml eingeengt. Zur dc-Prüfung unter den beschriebenen Bedingungen wurden etwa 20 μ l dieser Lösung genommen: es ließ sich lediglich F_3 nachweisen.

b) Mikropraeparative Isolierung der Verbindung F_3

Etwa 1 ml Essigesterstammlösung wurde in Form eines Streifens auf eine Polyamid-Cellulose-Dünnschichtplatte aufgetragen und das Chromatogramm in dem Benzol/Methanol/Wasser-Gemisch entwickelt. Die Zone mit F_3 wurde aus dem Chromatogramm gekratzt. Vom Adsorbens wurde mit 8 ml Methanol kalt eluiert, die Lösung filtriert und zur Aufnahme des UV-Spektrums verwandt. Die Verbindung besitzt Absorptionsmaxima bei 270 und 340 nm.

2) Vorproben zum Nachweis eines Leucoanthocyans

50,0 g Droge (mit Petrolaether vorextrahiert) wurden 20 Minuten lang mit 100 ml 5 %iger Salzsäure in 50 %igem Methanol zum Sieden erhitzt, dabei färbte sich die Lösung intensiv rot. Nach dem Erkalten der Lösung wurde mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und mehrmals mit insgesamt 50 ml Amylalkohol ausgeschüttelt. Die Amylalkoholphase färbte sich kräftig rot, die Farbe war jedoch nur kurze zeitlang beständig. Wir erhielten das gleiche Ergebnis mit einer Droge, die mit Petrolaether und Methanol vorextrahiert war. Beim Einengen der salzsäuren Methanollösung i.Vak. trat eine braunschwarze Fällung auf, die nach dem Trocknen ein braunschwarzes, in Wasser und Alkohol kaum lösliches Pulver bildete.

Einige mg der Substanz gaben mit 3 ml 5%iger Vanillinlösung in Aethanol auf Zusatz von 25%iger Salzsäure eine intensiv rote Farbreaktion.

- 3) Prüfung von Alkoholextrakten auf Anthranilsäure
und mikropraeparative Isolierung
a) Chromatographischer Nachweis

Ein Aetherauszug aus dem Methanolextrakt der getrockneten Früchte, ein Aetherauszug aus der Urtinktur "Sabal serrulatum" (18) und die Urtinktur "Sabal serrulatum" wurden papierchromatographisch und dünnschichtchromatographisch an Cellulose geprüft. Als Bezugssubstanz wurde Anthranilsäure cochromatographiert.

Vorschriften zur Herstellung der Aetherauszüge aus dem Methanolextrakt und der Urtinktur:

50,0 g Droge wurden mit Petroläther (40-60° siedend) vorextrahiert, dann mit Methanol erschöpfend am Soxhlet extrahiert. Man erhielt nach dem Verdampfen des Lösungsmittels ca 3,0 g Methanolextrakt. 1,0 g dieses Extraktes wurden in 20 ml 50 %igem Methanol gelöst, dreimal mit je 10 ml Aether ausgeschüttelt, die vereinigten Aetherauszüge zur Trockne eingeengt, der Verdampfungsrückstand in 3 ml Aethanol gelöst. Diese Lösung diente als Prüflösung a für die Chromatographie.

10 ml Urtinktur "Sabal serrulatum" wurden i.Vak. auf 5 ml eingeengt, hernach mit 10 ml Wasser versetzt und dreimal mit je 10 ml Aether ausgeschüttelt. Die Aetherauszüge wurden zusammen zur Trockne eingeengt und die Lösung des Rückstandes in 3 ml Aethanol chromatographiert (Probelösung b).

Vergleichsweise wurde die Urtinktur "Sabal serrulatum" als Probelösung c verwendet.

Prüf- lösung	Rf-Wert	Fluoreszenz im UV-Licht	Färbung am Tageslicht
a	0,97 0,87 0,66	gelbbraunrot blau blau	farblos gelb farblos
b	0,87 0,61	blau blau	gelb farblos
c	0,87 0,58	blau blau	gelb farblos
As	0,87	blau	gelb

Tabelle 2: Papierchromatographischer Nachweis der Anthranilsäure (As) in Alkoholauszügen aus den Serenoafrüchten

Laufmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4/1/1 (v/v)

Laufhöhe: 15 cm; je 20 µl der Probelösungen wurden aufgetragen, As in 1%iger Lösung

Sprühreagenz: Vanillin-Salzsäure (0,5 g Vanillin in 50 ml HCl (1,19) gelöst

Fluoreszenz im UV-Licht bei 365 nm

Prüf- lösung	Rf-Wert	Fluoreszenz im UV-Licht	Färbung am Tageslicht
a	0,86 0,77 0,56 0,36 0,25 0,10 Start- punkt	rötlich blau blau blau blau blaugrau rötlich	gelbbraunlich hellbeige farblos farblos farblos farblos hellgraublau
b	0,77	blau	hellbeige

Prüf- lösung	Rf-Wert	Fluoreszenz im UV-Licht	Färbung am Tageslicht
c	0,86	rötlich	gelbbraunlich
	0,77	blau	farblos
	0,14	fahl blau- grau	farblos
	Start- punkt	rötlich	hellgelbbraun
As	0,77	blau	hellbeige

Tabelle 3: Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Anthranilsäure (As) in Alkoholauszügen aus den Serenoafrüchten

Adsorbens: Cellulose (Pulver zur analytischen Chromatographie der Fa. Excorna, Mainz)

Laufmittel: 2%ige wässrige Essigsäurelösung

Laufhöhe: 11 cm

Sprühreagenz: Prochazka-Reagenz (10 ml Formaldehyd, 10 ml HCl 25%, 20 ml Aethanol)

Fluoreszenz im Uv-Licht bei 365 nm

- b) Mikropreparative Isolierung
a) aus der Urtinktur

In Vorversuchen mit authentischer Anthranilsäure wurde deren Verhalten studiert: es wurden Verteilungskoeffizienten zwischen Pufferlösungen nach Sörensen und Chloroform in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt, indem jeweils 50 mg Anthranilsäure (Testsubstanz) in 10 ml Pufferlösung gegebenfalls unter ganz gelindem Erwärmen gelöst und mit kleinen Portionen Chloroform (insgesamt 10 ml) ausgeschüttelt wurden. Die Verdampfungsrückstände der Chloroformauszüge der einzelnen Proben wurden ausgewogen. Dabei zeigte sich, daß die Anthranilsäure aus der wässrigen Phase im pH-Intervall 4,6 bis 5,6 am leichtesten in die Chloroformphase überführbar ist.

pH-Wert der As-Lösung	K _{20°}
1,50	10,68
2,67	2,37
3,40	0,91
4,12	0,83
4,63	0,54
5,68	0,56
5,98	1,26
6,58	2,70
7,06	18,55
7,80	50,30
8,35	62,70

Die authentische Anthranilsäure kristallisierte aus konzentrierten wässrigen Lösungen in Nadeln, aus konzentrierten Benzollösungen in Form rechteckiger Kristalle, aus Benzollösungen unter Zusatz von Petrolaether sehr schnell in winzigen Kristallen und aus verdünnten Cyclohexanlösungen ebenso. Sie schmolz nach dem Umkristallisieren bei 143-148°. Sublimationsversuch mit authentischer Anthranilsäure: bei einer Metallbadtemperatur von 100° erhielt man bei redu-

Tabelle 4: Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten (K_{20°}) der Anthranilsäure (As) im System Chloroform/Phosphatpuffer nach Sörensen vom pH der wässrigen Lösung

ziertem Druck (0,2 mm Hg) ein weißes Sublimat.

500 ml Urtinktur (457 g; entsprechend ca 500 g Droge) der Früchte von *Serenoa repens* wurden schonend vom Lösungsmittel befreit. Es blieben 27 g zähflüssiger brauner Extrakt zurück. Dieser Extrakt wurde mit 50 ml Wasser versetzt und erschöpfend mit Petrolaether (40 - 60° siedend) extrahiert; diese Ausschüttelung wurde verworfen. Der wässrige Rückstand der Petrolaetherausschüttelung wurde auf einen pH von 4,6 gebracht und erschöpfend mit Chloroform extrahiert, die Chloroformlösung über Natriumsulfat getrocknet und i.Vak. eingeeengt. Man erhielt 25 mg Trockenrückstand (bezogen auf die Urtinktur entspricht das etwa 5%), der nach der papierchromatographischen Prüfung stark mit Anthranil-

säure angereichert war. Dieser Extrakt wurde im Vakuum bei 0,2 mm Hg und 100-120° Metallbadtemperatur der Sublimation unterworfen. Man erhielt ein hellgelbes feieliges Produkt, das jedoch weder in Benzol auf Zusatz von Petrolaether, noch in Cyclohexan zur Kristallisation gebracht werden konnte. Nach eintägigem Stehen an der Luft bei Raumtemperatur vertiefte sich die Farbe des feieligen Produktes nach Rotbraun. Die Menge des erhaltenen Sublimates war so gering, daß sie eben zur chromatographischen Prüfung ausreichte, nicht jedoch für weitere Versuche, die Anthranilsäure daraus rein kristallin zu erhalten.

B) aus dem Methanolextrakt

Zur Gewinnung einer größeren Menge eines mit Anthranilsäure angereicherten Extraktes wurden die Ausschüttelungsrückstände von der Gewinnung des unverseifbaren Anteiles aus dem Methanolextrakt aus den Früchten von *Serenoa repens* aufgearbeitet. Dazu wurden die Verseifungslaugen auf den pH von etwa 4,6 gebracht und erschöpfend mit Chloroform extrahiert. Die filtrierte Chloroformlösung wurde mit 1n-HCl ausgeschüttelt. Zur möglichst schnellen Phasentrennung wurde das Gemisch zentrifugiert, die Oberphase nach dem Zentrifugieren abgehebert, mit Natriumbicarbonat auf den pH 4,6 gebracht (Universalindikatorpapier Merck) und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformlösung lieferte nach dem Einengen i. Vak. 215 mg eines mit Anthranilsäure angereicherten Extraktes. Dieser Extrakt wurde in 2 %iger Essigsäure gelöst und auf eine Säule (3,5 cmØ; 80,0 g Cellulosepulver in 2 %iger Essigsäure suspendiert) aufgetragen. Die Säule wurde mit 2 %iger Essigsäure entwickelt und eluiert. Im langwelligen UV-Licht wurde eine intensiv blau fluoreszierende Zone beobachtet. Das hellgelbe essigsaure Eluat dieser Zone wurde getrennt aufgefangen, mit Natriumbicarbonat auf den Ph von etwa 4,6 gebracht und

mit fünf Portionen zu je 30 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformauszüge wurden über Natriumsulfat getrocknet und lieferten nach dem Verdampfen des Chloroforms 78 mg Rückstand.

Dieses angereicherte Substanzgemisch hatte im Lösungsmittelsystem: Chloroform/ 0,15 mol Phosphatpuffer nach Sörensen (Stammlösung: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 3,4\%$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 96,6\%$; mit einem pH-Wert von 5,5) den Verteilungskoeffizienten 1. In einem 25-stufigen Grundprozeß einer einfachen Craig-Verteilung wurde es in der Mikroverteilungsbatterie nach Hecker (3 ml Oberphase, 3 ml Unterphase) verteilt.

Die dc-Prüfung der Phasen der einzelnen Elemente an Cellulose zeigte, daß die Elemente 11 bis 25 chromatographisch reine Anthranilsäure enthielten. Die gesammelten Phasen dieser Elemente wurden i.Vak. eingengt. Man erhielt einen gelbbraunen Rückstand. Kristallisationsversuche aus Cyclohexan lieferten aus konzentrierter Lösung wenige mg einer zähen, braungefärbten Masse, die winzige Kristalle enthielt, sie hatte einen Schmelzbereich von $71-120^\circ$. Dieses Rohprodukt wurde nach KOFLER und WANNENMACHER (157) durch Absaugen der eutektischen Schmelze gereinigt.

Auf einen Objektträger wurde ein Stück gehärtetes Filtrierpapier gelegt und das Substanzgemisch gleichmäßig darauf verteilt. Quer darüber wurde ein zweiter Objektträger gelegt. Der Heiztisch des Schmelzpunktparates wurde auf 60° vorgewärmt, der Widerstand auf 145° eingestellt. Bei Temperaturanstieg zeigten sich auf dem Filterpapier öelig durchscheinende Flecke. Nun wurde der obere Objektträger mit einem Glasstab fest auf die Substanz gedrückt und mit der anhaftenden Substanz abgehoben. Das Filterblättchen wurde gewechselt, ein neuer Objektträger aufgelegt. Sobald bei weiterem Erwärmen auf dem Filterpapier wieder Flecke zu beobachten waren, wurde in gleicher Weise - insgesamt dreimal - gewechselt. Dabei stieg die Temperatur auf 150° an. Der

Schmelzpunkt der so gereinigten Anthranilsäure lag nun bei 138-146°. Der Mischschmelzpunkt mit der authentischen Vergleichssubstanz ergab keine Depression. Die im Mikromaßstab isolierte Anthranilsäure wurde vergleichend mit authentischer Substanz chromatographiert. In allen nachfolgend beschriebenen Chromatographiesystemen erwiesen sich Laufhöhe und Anfärbereaktion der isolierten Anthranilsäure und authentischer Vergleichssubstanz als übereinstimmend.

Adsorbens	Laufmittel (v/v)	Sprühreagenz Vanillin HCl Formaldehyd HCl	Rf-Werte	
			As _I	As _V
Papier	n-Butanol 2 Benzol 2 Wasser 3	TL:gelb TL: - UV:blau UV: -	0,83	0,83
Kiesel- gel GF	n-Dibutyl- aether 90 (wasser- gesättigt) Eisessig 9	TL: - UV: - kurzw.UV: vor dem Besprü- hen Fluo- reszenz- löschung	0,37	0,37
Cellu- lose	Essig- säure 2%	TL: rot TL: beige UV: blau	0,70	0,70

Tabelle 5: pc- und dc-Prüfung der isolierten Anthranilsäure (As_I) und Vergleich mit authentischer Substanz (As_V)

(TL: Färbung am Tageslicht nach Behandlung mit dem Sprühreagenz

UV: Fluoreszenz im UV-Licht bei 365 nm nach Behandlung mit dem Sprühreagenz)

- 4) Voruntersuchungen zum Nachweis von Sterinen
- a) Fraktionieren eines Petrolaetherextraktes

10,0 g Petrolaetherextrakt aus den getrockneten Früchten wurden in 30 ml Hexan gelöst und auf eine

Kieselgelsäule (5 cm Ø; 300,0 g Kieselgel 0,05 - 0,20 mm Ø ; in Hexan suspendiert) aufgetragen. Die Säule wurde mit Hexan entwickelt: eine schmale gelborange Zone wanderte mit der Front, die mit 200 ml Hexan eluiert wurde. An der Startfläche blieb eine breite gelbrote Zone hängen. Anschließend wurde mit hochsiedendem Petrolaether (60-80°) eluiert (30 ml Eluat mit 1,5 g gelbweißem, halbfestem Verdampfungsrückstand). Bei Elution mit Petrolaether/Benzol = 2/1 (v/v) bildeten sich von unten nach oben eine hellgraue breite, eine hellgelbe und eine orangefarbene Zone aus, an der Startfläche verblieb ein bräunlicher Rest, das Eluat der ersten beiden Zonen (200ml) lieferte 3,2 g hellgelben, öligen Verdampfungsrückstand. Nach Übergang zu reinem Benzol als Elutionsmittel löste sich aus der gelborangen oberen Zone eine graue oder durchscheinend am Tageslicht sich an der Säule abzeichnende Zone, die sich schnell über die ganze Säule verteilte. 300 ml Eluat lieferten nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels 2,3 g eines gelblichen gelartigen Verdampfungsrückstandes. In der Folge wurde mit Benzol-Chloroform-Mischungen mit stufenweise gesteigertem Chloroformzusatz eluiert. Aus der an der Startfläche bis dahin zurückgehaltenen braunen Zone löst sich nunmehr eine rotorange und eine grüne Zone: das Eluat wurde in fünf Fraktionen zu je 100 ml getrennt aufgefangen. Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Sterine geprüft. Adsorbens: Kieselgel G; Laufmittel: Cyclohexyn/ Essigester = 2/8 (v/v); Sprühreagenz: Essigsäureanhydrid + conc. Schwefelsäure = 20+1 (v/v). Alle Fraktionen schwänzten im Chromatogramm sehr stark, nur in dem Petrolaether-Benzol-Eluat war ein Substanzfleck ($R_f = 0,89$), im Benzoleluat waren 2 Substanzflecke mit positiver Liebermann-Burchard-Reaktion ($R_f = 0,74$, $R_f = 0,85$) zu erkennen.

- b) Säulenchromatographie eines Methanolextraktes an Aluminiumoxyd und Kieselgel
α) Vortrennung an Aluminiumoxyd

500,0 g Rückstand vom Methanolextrakt aus ca 3,0 kg getrockneten Früchten, die mit Petroläther (40-80°) und Methylenchlorid vorextrahiert waren, wurden mit Essigester durchgerührt, bis die Essigesterphase farblos war. Die gesammelten Auszüge, die im langwelligen UV-Licht gelbgrün fluoreszierten, wurden i.Vak. zur Trockne eingengt. Man erhielt 55,0 g zähflüssigen Extraktionsrückstand. Von diesem Rückstand wurden 26,0 g in 30 ml Essigester gegeben und auf eine Säule mit 550,0 g Aluminiumoxyd neutral der Aktivitätsstufe IV in Essigester aufgetragen (Säule 5 cm Ø). Die Säule wurde mit Essigester entwickelt und eluiert. Es bildeten sich zahlreiche verschiedenfarbige Zonen aus: die erste sich von der Startfläche ablösende Zone erschien am Tageslicht gelbgrün, das Essigestereluat dieser Zone (500ml) war hellgelb gefärbt und lieferte nach dem Einengen i.Vak. 4,0 g Trockenrückstand. Auf eine an der Säule breit ausgedehnte Zwischenzone folgten eine schmale hellgelbbraune Zone und zahlreiche dicht aufeinanderfolgende grüne Zonen, die nicht mehr eluiert wurden.

- β) Säulenchromatographie des Eluats der ersten Zone

4,0 g Trockenrückstand des Eluats der gelbgrünen Zone wurden in Benzol gelöst auf eine Säule (3,5 cm Ø) mit 100,0 g Kieselgel G in Benzol gegeben. Die Säule wurde bei einer Durchtropfgeschwindigkeit von etwa 30 Tropfen pro Minute mit Benzol entwickelt und das Eluat in Fraktionen zu 100 ml getrennt aufgefangen. Es bildeten sich eine gelbe, gelbgrüne, orangefarbene, grüne und blaugrüne Zone aus. Im Anschluß an die Elution mit Benzol (Fraktionen 1 bis 3) dienten Benzol-Chloroform-Mischungen (Fraktionen 4 bis 7), Chloroform (Fraktionen 8 bis 14) und Essigester (Fraktionen 15 bis 18) als Elutionsmittel.

Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch an Kieselgel auf Inhaltsstoffe geprüft, die eine positive Liebermann-Burchard-Reaktion gaben (Laufmittel: Cyclohexan/Essigester = 2/8 (v/v); Sprühreagenz: Essigsäureanhydrid + conc. Schwefelsäure = 20 +1 (v/v); 10 Min. 120°). Alle Fraktionen schwänzten im Chromatogramm stark, ein Substanzfleck ($R_f=0,80$) mit deutlich positiver Liebermann-Burchard-Reaktion war nur in der Fraktion 9 zu beobachten (Verbindung M_1). Nach dem Einengen i.Vak. der 9. Fraktion erhielt man 750 mg Trockenrückstand, der nunmehr in Chloroform gelöst, auf eine Säule (2 cm $\varnothing$) mit 20,0 g Kieselgel G in Chloroform aufgetragen wurde. Die Säule wurde mit Chloroform entwickelt und eluiert, das Eluat in 12 Fraktionen zu je 30 ml getrennt aufgefangen. Es bildeten sich eine gelbe und folgend drei grüne Zonen aus, an der Startfläche blieb eine graubraune Zone hängen. Aus dem Eluat der dritten grünen Zone (hauptsächlich Fraktion 6) konnte nach eintägigem Stehen bei 20° eine mikrokristalline Substanz isoliert werden, die nach mehrmaligem Umkristallisieren aus absolutem Aethanol ca 8 mg farbloser Nadelchen mit dem Schmelzpunkt 139,5-140° lieferte.

C) Auftrennung des unverseifbaren Anteiles aus dem Petrolaetherextrakt

1) Isolierung des Unverseifbaren

400,0 g Epi- und Mesocarp der Früchte von *Serenoa repens* wurden grob gepulvert und mit Petrolaether (40-60°) 24 Stunden lang am Soxhlet erschöpfend extrahiert. Nach dem Abdestillieren des Petrolaethers erhielt man 73,0 g Extrakt, der durch 1 1/2-stündiges Kochen mit 150 ml 20%iger aethanolischer Kalilauge auf dem Wasserbade verseift wurde. Der Alkohol wurde i.Vak. zur Hälfte aus der Verseifungslauge abdestilliert, zum Destillationsrückstand wurden 100 ml Wasser gegeben und durch Ausschütteln die Gesamtmenge des Unverseifbaren in Petrolaether aufgenommen. Der Petrolaetherauszug wurde

dreimal mit je 20 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i.Vak. zur Trockne eingengt. 100,0 g Drogenpulver lieferten bei dieser Aufarbeitung etwa 1,4 g unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes.

2) Dünnschichtchromatographie des Unverseifbaren

Rf-Wert	Substanz	Färbung am Tageslicht	Fluoreszenz im UV-Licht
0,97	α 6	bräunlich	unspezifisch dunkelbraun
0,90	α 5	blaugrau	fahl rötlich
0,83	α 4	rötlich	fahl rötlich
0,76	α 3	rotblau	schwach rot
0,64	α 2	hellbraunrot	rötlich
0,52	α 1	rosarot - violett	leuchtend ziegelrot
0,52	β -Sito-sterin	rosarot-violett	leuchtend ziegelrot

Tabelle 6: Rf-Werte, Färbungen und Fluoreszenzen der im Chromatogramm nach Behandlung mit dem Sprühreagenz beobachteten Flecke
 Adsorbens: Kieselgel G
 Laufmittel: Chloroform + Aceton = 9 + 1 (v/v)
 Sprühreagenz: R_1 ; 10 Min. 120°
 Prüflösung: 7 %ige (g/v) Lösung des Unverseifbaren in Petroläther

3) Säulenchromatographie des Unverseifbaren

a) Grobfractionieren an Kieselgel

500 mg des unverseifbaren Anteiles wurden an einer Kieselgelsäule (15,0 g Kieselgel 0,05-0,20 mm ϕ ; in

Petrolaether suspendiert; Säule 1,5 cm Ø) chromatographiert. Dazu wurde das Unverseifbare in 5 ml Petrolaether gelöst auf die Säule aufgetragen, mit Petrolaether entwickelt und eluiert. Es bildeten sich eine schmale hellgelbe, eine gelbgrüne, eine rote und folgend eine rotorange und gelbrotorange Zone aus. An der Startfläche blieb eine schmale rotbraun gefärbte Zone hängen. Anschließend wurde mit Benzol, Chloroform, Aether, Essigester und Aceton eluiert. Das Eluat wurde bei einer Durchtropfgeschwindigkeit von ca 30 Tropfen pro Minute in Fraktionen zu 75 ml getrennt aufgefangen, die Lösungen wurden im Vakuum auf jeweils ca 10 ml eingengt. Diesen Konzentraten wurden 10 µl zur dc-Prüfung entnommen.

Tabelle 7: dc-Prüfung der Fraktionen der säulen-
chromatographischen Auftrennung des
Unverseifbaren
Adsorbens: Kieselgel G
Laufmittel: Chloroform + Aceton = 9 + 1
(v/v)
Sprühreagenz: R_1 ; 10 Min. 120°
(Farben: blg= blaugrau; br= bräunlich;
fr= fahl rötlich; hb= hellbraunrot;
lzt= leuchtend ziegelrot; r= rötlich;
rb= rotblau; rr= rosarot-violett;
sr= schwach rötlich; udb= unspezifisch
dunkelbraun)

Fraktion	Elutionsmittel (Vol. %)	Farbe des Eluats	Farbe am TL	Fluores- zenz im UV	Rf-Wert
1	Petrolaether	farblos	blg	fr	0,97
2	Petrolaether + 50% Benzol	gelb- lich	blg	fr	0,97
3	Benzol	rot	blg	fr	0,97
4	Benzol	gelb- lich	blg	fr	0,97
5	Benzol+50% Chloroform	gelb- orange	br r	udb fr	0,98 0,96
6	Chloroform	gelb- lich	br rb	udb fr	0,98 0,88
7	Chloroform	gelb	br rb hb	udb fr r	0,98 0,88 0,73
8	Chloroform	gelb	br rb hb rrv	udb sr r lzz	0,98 0,88 0,73 0,63
9	Chloroform	orange	br rb hb rrv- blg	udb sr r lzz	0,98 0,88 0,73 0,63
10	Chloroform + 50% Aether	gelb- orange	br hb rrv	udb r lzz	0,98 0,73 0,63
11	Aether	hellgdb	rrv	lzz	0,63
12	Essigester	hellgelb	rrv	lzz	0,63
13	Aceton	-	-	-	-
B-Si- toste- rin	-	-	rrv	lzz	0,63

b) Isolierung der Verbindung Pe_1

Die Fraktionen 7 bis 9 enthielten eine nach eintägigem Stehen der Lösungen bei Zimmertemperatur gut kristallisierende Substanz, die abgetrennt und zuerst aus Chloroform, hernach aus Diaethylaether umkristallisiert wurde (Pe_1). Man erhielt 13,0 mg Pe_1 mit dem Fp: 82-83°.

Elementaranalyse:

Pe_1 wurde im Vakuum (12 mm Hg) bei 50° getrocknet.

Gefunden: C	81, 26	H	14, 46
	81, 13		14, 37
	81, 18 %		14, 42 %

Nachdem Stickstoff aus der Substanz nicht nachzuweisen war (Probe nach Lassaigne), wurde der Sauerstoffanteil zu 4,40 % errechnet. Aus den Werten ließe sich die Summenformel: $C_{24}H_{50}O$ aufstellen; für C, H und O errechnet sich bei dieser Summenformel:

C 81,28 % H 14,21 % O 4,51 %

Das IR-Absorptionsspektrum der Verbindung Pe_1 wurde im Bereich 700-4000 cm^{-1} in KBr gemessen (c= 2 mg/200 mg KBr).

ν_{max} (cm^{-1}) = 3300s, 2970s, 2800s, 2600m, 2250w, 1465s, 1460s, 1375m, 1115w, 1060m, 725m, 715s
(s = starke Bande, m = mittelstarke Bande, w = schwache Bande)

c) Isolierung der Verbindung α_1

Etwa 100 mg Verdampfungsrückstand des Filtrates der Fraktionen 7 bis 9 und der Fraktionen 10 bis 12 der vorangegangenen säulenchromatographischen Trennung an Kieselgel, die α_1 angereichert enthielten, wurden in Benzol gelöst und auf eine Kieselgelsäule (1,5 cm Ø; 25,0 g Kieselgel 0,05-0,20 mm Ø, in Benzol suspendiert) aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit Benzol entwickelt und eluiert. Es bildete sich eine gelborange-

farbene Zone aus. Nachdem man 150 ml Benzoleluat erhalten hatte, wurde weiter mit Chloroform (150ml) und darauf mit Aceton (100ml) eluiert (ca 20 Tropfen Eluat pro Minute). Aus dem Verdampfungsrückstand des Chloroformeluats erhielt man nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol unter Zusatz von Diaethylaether ca 5 mg α_1 in Form feiner Nadeln mit dem Fp: 137-138°.

d) Charakterisierung der Verbindung α_1 durch analytische Methoden

Farbreaktion:

Werden einige mg α_1 in 3 ml Essigsäureanhydrid gelöst und mit 3 bis 5 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt, dann färbt sich die Lösung sehr kurz intensiv violett, dann blaugrün und nimmt endlich eine beständige smaragdgrüne Färbung an (positive Reaktion nach Liebermann-Burchard).

Chromatographisches Verhalten:

Die Verbindung zeigt genau das gleiche Verhalten wie authentisches β -Sitosterin.

a) Dünnschichtchromatographie an Kieselgel:

Laufmittel: Chloroform/Aceton=8/2 (v/v); R_f = 0,63

Prüflösung: 5 μ l einer 50 mg %igen Lösung von α_1 in Chloroform

Sprühreagenz: 1) R_1 , 10 Min. 120°

Anfärbereaktion: am Tageslicht rosa-rotviolett, im UV bei 365 nm ziegelrote Fluoreszenz

2) gesättigte Antimontrichloridlösung in Chloroform + Essigsäureanhydrid = 1 + 1 (v/v); 5 Min. 110°

Anfärbereaktion: am Tageslicht rötliche bis violette Färbung

b) Papierchromatographie:

Papierstreifen: 20 x 3 cm wurden mit einer 10%igen Lösung

von Paraffinöl in Diaethylaether im-
prägniert

Prüflösung: 10 µl einer 50 mg %igen Lösung von α_1 in
Chloroform

Laufmittel: Eisessig/ Chloroform/ Paraffinöl = 65/ 25/ 10
(v/v) (System nach Michalec (159))

Rf-Wert: 0,87

Sprühreagenz: 10 %ige Lösung von Phosphorwolframsäure
(g/v) in Aethanol; 10 Min. 110°

Anfärbereaktion: am Tageslicht rotviolett,
im UV-Licht bei 365 nm rotorangefarbene
Fluoreszenz

Schmelzpunkt:

α_1 hatte nach dem Umkristallisieren aus Methanol/
Aether einen Fp: 137-138° (feine Nadeln) und nach dem
Umkristallisieren aus absolutem Aethanol den Fp:
139-140° (Plättchen). Der Mischschmelzpunkt mit dem aus
den entsprechenden Lösungsmitteln umkristallisierten
authentischen β -Sitosterin zeigte keine Depression.
Spezifische Drehung:

Die aus Aethanol umkristallisierte Verbindung α_1
wurde vor der Bestimmung in der Trockenpistole über
 P_2O_5 (100°; 12 mm Hg) bis zum konstanten Gewicht ge-
trocknet. Die spezifische Drehung wurde in Chloroform
bestimmt: $c = 1$ g/ 100 ml

spezifische Drehung der Verbindung α_1 : $[\alpha]_D = - 32,7^\circ$

spezifische Drehung des authentischen

β -Sitosterins: $[\alpha]_D = - 32,3^\circ$

Elementaranalyse:

Zur Vorbereitung wurde α_1 im Hochvakuum bei 80°
getrocknet.

Gefunden: C 83,61% H 11,93%

Berechnet für $C_{29}H_{50}O$ (414,40)

C 83,99% H 12,15%

Acetylverbindung des α_1 :

Gefunden: C 80,94; 80,74 H 11,32; 11,42

Berechnet für das Monoacetat: $C_{31}H_{52}O_2$ (456,42)

C 81,52% H 11,48%

IR-Absorptionsspektrum:

Das Spektrum wurde a) im Bereich $650 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ und
b) im Bereich $1300 - 4000 \text{ cm}^{-1}$
aufgenommen. Im Bereich a) wurde das Spektrum in Schwefelkohlenstoff gemessen, in dem Bereich b) in Tetrachloraethylen; c = 10 mg/ 1 ml.

Die Absorptionsbanden lagen bei folgenden Wellenzahlen:

$\gamma_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) =$ a) 1370s, 1330m, 1300w, 1263w, 1212w,
1180w, 1125w, 1100w, 1048s, 1020m,
1006m, 990w, 960m, 930w, 840m, 800m,
780w, 740w
b) 3630w, 2950s, 2870s, 2500w, 1880w,
1760 w, 1660w, 1463m, 1440w, 1380m.
(s= starke Bande, m= mittelstarke Bande,
w= schwache Bande)

Acetylverbindung des α_1 :

50 mg α_1 wurden in 3 ml Pyridin gelöst und mit 5 ml Essigsäureanhydrid versetzt, 24 Stunden lang bei 18° stehengelassen. Dann wurde das Reaktionsprodukt mit Eis gekühlt und in 50 ml eisgekühltes Wasser unter kräftigem Umrühren eingegossen. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und aus Methanol unter Zusatz von Aether umkristallisiert; Fp: 129° .

D) Auftrennung des unverseifbaren Anteiles aus dem Methylenchloridextrakt

1) Isolierung des Unverseifbaren

100,0 g mit Petrolaether vorextrahiertes Epi- und Mesocarp der Früchte lieferten bei der erschöpfenden Soxhletextraktion mit Methylenchlorid während 20 Stunden nach dem Abdampfen des Lösungsmittels 0,6 g Methylenchloridextrakt. Dieser Extrakt wurde durch einstündiges Kochen mit 30 ml 20 %iger aethanolischer Kalilauge auf dem Wasserbade verseift. Nachdem der Alkohol zur Hälfte aus der Verseifungslauge abdestilliert worden war, wurden 100 ml Wasser hinzugefügt und die Gesamtmenge des Unverseifbaren in Diaethylaether aufgenommen. Die Aetherlösung

wurde mit Wasser alkalifrei gewaschen und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde in 10 ml Essigester bei 60° gelöst, die Lösung nach dem Erkalten filtriert und i. Vak. zur Trockne eingeeengt. 100,0 g Drogenpulver lieferten dabei etwa 50 mg unverseifbaren Anteil des Methylenchloridextraktes.

2) Dünnschichtchromatographie des Unverseifbaren

Rf-Wert	Substanz	Färbung am Tageslicht	Fluoreszenz im UV
0,90		farblos	fahl blaugrau
0,80		rotblau	schwach rot
0,70		hellbraunrot	rötlich
0,63	α_1	rötlich	rötlich
0,50	β_1	farblos	blaugrau
0,33	β_2	gelbrot	intensiv gelb
0,10	β_3	farblos	fahl blaugrau
0,06	β_4	rosarot-violett	leuchtend ziegelrot
0,63	B-Sito-sterin	rosarot-violett	leuchtend ziegelrot

Tabelle 8: Rf-Werte, Färbungen am Tageslicht und Fluoreszenz im UV-Licht bei 365 nm der nach Behandlung mit dem Sprühreagenz R_1 zu beobachtenden Flecke

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Chloroform + Aceton = 8 + 2
(v/v)

Prüflösung: 30 μ l einer 5%igen Lösung des Unverseifbaren in Aether (g/v)

3) Säulenchromatographie des Unverseifbaren

a) Säulenchromatographische Grobtrennung

Etwa 10,0 g unverseifbarer Anteil eines Methylchloridextraktes aus getrockneten Früchten, die mit Petroläther (40-80°) vorextrahiert waren, wurden in 30 ml Benzol teilweise gelöst und auf eine Säule mit 250,0 g Kieselgel (Säule 5 cm Ø; Kieselgel 0,05-0,20 mm Ø, in Benzol suspendiert, nach dem Absitzen des Kieselgels 33 cm hoch) in Benzol aufgetragen. Anfangs wurde mit Benzol entwickelt und eluiert (Durchtropfgeschwindigkeit 40 Tropfen pro Minute). Eine gelborange Zone lief vor, eine breite rotbraune Zone blieb an der Startfläche hängen. In der Folge dienten Mischungen von Benzol und Chloroform, Chloroform und Äther, sowie Äther, Äther und Essigester, Essigester, Essigester und Aceton als Elutionsmittel.

Tabelle 9: dc-Prüfung des Eluates der säulenchromatographischen Trennung des Unverseifbaren an Kieselgel

Laufmittel: für die Fraktionen 1-10:

Chloroform/Aceton=9/1 (v/v)

für die Fraktionen 11-15:

Chloroform/Aceton= 1/9 (v/v)

Sprühreagenz: R₁, 10 Min. 120°

Prüflösung: jeweils ca 30 µl Eluat

(Farben: fg= fahl grünlich; f= farblos;
fh= fahl hellblau; fr= fahl rötlich; g=
intensiv gelb; gbr= gelbbraunrot; gr=
gelbrot; hb= hellbraunrot; hg= hellgelb;
hgg= hellgelbgrün; lzt= leuchtend ziegel-
rot; rb= rotblau; rrv= rosarot-violett;
sr= schwach rötlich)

Elutions- mittel (Vol. %)	Frak- tion	Farbe des Eluats	Eluat in ml	Färbung am Tages- licht	Fluoreszenz im UV-Licht bei 350 nm	Rf-Wert
Benzol 400 ml	1	farb- los	200	r	fr	0,96
	2	farb- los	30	r f	fr blg	0,96 0,93
	3	gelb	80	r f	fr blg	0,96 0,93
Benzol + 5% CHCl ₃ 100 ml	4	gelb	75	r f	fr fh	0,96 0,90
	5	gelb	100	r rb hb	fr fr sr	0,96 0,91 0,82
Benzol + 10% CHCl ₃ 100 ml	6	hell- gelb	70	hb	sr	0,82 schwänzt
Benzol + 15% CHCl ₃ 100 ml	7	hell- gelb	50	hb rrv	sr lzt	0,82 0,68 schwänzt
Benzol + 20% CHCl ₂ 200 ml; Benzol + 25% CHCl ₃ 250 ml; CHCl ₃ 100 ml	8	fahl- gelb	250	rrv	lzt	0,68 schwänzt
	9	gelb- braun	200	rrv hg	lzt fg	0,68 0,60 schwänzt
CHCl ₃ +10% Aether 50 ml; CHCl ₃ +20% Aether 50 ml; Aether 100 ml	10	gelb- rot	200	hgg gr	fg g	0,50 0,30
Aether + 50% Essig- ester 200ml	11	rot- gelb	175	gbr gr	fr g	0,90 0,70
Essigester 100 ml; dto +50%Aceton 100 ml	12	gelb- lich	200	gbr	fr	0,90 schwänzt

Elutions- mittel (Vol. %)	Fraktion	Farbe des Eluats	Eluat in ml	Färbung am Tages- licht	Fluores- zenz im UV-Licht bei 350 nm	Rf-Wert
Aceton 100 ml	13	fahl- gelb	150	-	-	schwärzt
Aceton + 50% Äethanol 100 ml	14	fahl- gelb	150	rrv	lzt	0,10
Aceton + 50% Äethanol 250 ml	15	gelb- lich	300	rrv	lzt	0,10
-	B-Si- toste- rin	-	-	rrv	lzt	0,68 (Lfm der Frakt. 1-10)

b) Säulenchromatographie B₂-angereicherter Fraktionen

Die bei der Grobtrennung des Unverseifbaren aus dem Methylenchloridextrakt angefallenen Fraktionen, die die Hauptmenge der Verbindung B₂ enthielten, wurden i. Vak. eingeengt und lieferten 1,13 g Verdampfungsrückstand. Dieser Extrakt wurde an einer Kieselgelsäule (100,0 g Kieselgel 0,05 - 0,20 mm Ø, in Diaethylaether suspendiert, Säule 3,5 cm Ø) mit Diaethylaether chromatographiert. Dazu wurde das angereicherte Substanzgemisch in 15 ml Diaethylaether gđöst und auf die Säule aufgetragen. Zuerst wurde mit Diaethylaether entwickelt und eluiert (Durchtropfgeschwindigkeit ca 30 Tropfen pro Minute), dabei lief eine breite hellgelbe Zone vor. Nach dem Übergang zu Essigester als Elutionsmittel bildeten sich keine weiteren am Tageslicht sichtbaren Zonen aus. Das Eluat wurde gleichmäßig zu 100 ml fraktioniert. Den einzelnen Fraktionen wurden ca 50 µl zur dc-Prüfung entnommen.

Elu- tions- mittel	Frak- tion	Farbe des Eluats	Färbung am Tageslicht	Fluoreszenz im UV-Licht bei 350 nm	Rf - Wert
Diaethyl- aether 900 ml	1	gelb	-	-	-
	2	gelb	rosarot- violett	leuchtend ziegelrot	0,54 schwänzt
	3	gelb- lich	rosarot- violett gelbrot	leuchtend ziegelrot intensiv gelb	0,54 0,26 schwänzt
	4	gelb- lich	farblos gelbrot	fahl blau intensiv gelb	0,36 0,26 schwänzt
	5	gelb- lich	gelbrot	gelb	0,26 schwänzt
	6	gelb- lich	leicht gelbrot	gelblich	0,26
	7	gelb- lich	-	-	schwänzt
Aether+ 10 Vol.% Essig- ester 50 ml; Essig- ester 50 ml	8	farb- los	-	-	-
	9- 11	farb- los	-	-	-
-	B-Sito- sterin	rosarot- violett	leuchtend ziegelrot	0,54	

Tabelle 10: dc-Prüfung des Eluats der Säulentrennung
 B_2 - angereicherter Fraktionen:
 Rf-Werte, Farbe und Fluoreszenz der im
 Chromatogramm beobachteten Flecke nach
 Behandlung mit dem Sprühreagenz R_1
 Adsorbens: Kieselgel G
 Laufmittel: Chloroform/Aceton = 8/2 (v/v)

Der Verdampfungsrückstand der Fraktionen 3 bis 5 wurde in 20 ml Chloroform gelöst und an einer Kieselgelsäule (4 cm Ø; 75,0 g Kieselgel 0,05-0,20 mm Ø, in Chloroform suspendiert) rechromatographiert. Die Säule wurde zunächst mit Chloroform entwickelt und eluiert, hernach wurde mit Chloroform-Essigester-Mischungen bei einer Durchtropfgeschwindigkeit von etwa 40 Tropfen pro Minute eluiert. Es lief eine am Tageslicht schmale hellgelbe Zone vor, darauf folgten eine schmale orangefarbene Zone, eine gelb gefärbte Zwischenzone und letztlich eine weitere orangefarbene Zone. Die einzelnen Fraktionen des Eluats wurden an Kieselgel dc-geprüft.

Elutionsmittel (Vol. %)	Fraktion	Eluat in ml	Farbe des Eluats	Farbe am Tages- licht	Fluores- zenz im UV-Licht bei 350 nm	Rf-Wert
CHCl ₃ 250 ml	1	100	farb- los	farb- los	fahl blau- grau	0,92
	2	100	farb- los	farb- los	fahl blau- grau	0,92
CHCl ₃ + 5% Essig- ester 100 ml	3	100	farb- los	farb- los	fahl blau- grau	0,86
CHCl ₃ + 10 % Essig- ester 250 ml	4	70	hell- gelb	fahl orange	fahl blau- grau	0,68
	5	120	orange	fahl orange	fahl blau- grau	0,68 schwänzt
	6	100	orange- gelb	fahl orange leicht rötl. gelb- rot	fahl blau fahl rot fahl gelb	0,68 0,59 0,33
CHCl ₃ + 30% Essig- ester 350 ml	7	100	gelb	gelbl. gelb- rot	- gelb	0,44 0,33

Elutionsmittel (Vol.%)	Fraktion	Eluat in ml	Farbe des Eluats	Farbe am Tages- licht	Fluores- zenz im UV-Licht bei 350 nm	Rf-Wert
	8	100	gelb	gelbl: gelb- rot	- gelb	0,44 0,33
	9	100	farb- los	-	-	-

Tabelle 11: dc-Prüfung des Eluats der zweiten Säulentrennung β_2 -angereicherter Fraktionen: Rf-Wert, Färbung und Fluoreszenz der beobachteten Flecke nach Behandlung mit dem Sprügreagenz R_1 , 10 Min. 120° (*: Färbung vor der Behandlung mit dem Sprühreagenz)
Prüflösung: je 40 μ l Lösung wurden den Fraktionen entnommen
Laufmittel: Chloroform/Aceton=8/2 (v/v)

Die Fraktionen 7 und 8 lieferten nach dem Einengen im Vakuum ca 130 mg Verdampfungsrückstand (=B). Chromatographisch ließ sich nach dem Besprühen mit R_1 lediglich β_2 nachweisen, Kristallisationsversuche aus den üblichen Lösungsmitteln blieben erfolglos. Daraufhin wurde ein Chromatogramm dieser Fraktion an Kieselgel GF mit Chloroform/Aceton=8/2 (v/v) entwickelt; nach dem Lufttrocknen der Platten wurde im kurzwelligen UV-Licht eine Fluoreszenzlöschung beim Rf: 0,33 beobachtet, die dem β_2 zuzuordnen ist. Das Chromatogramm wurde nun mit halbkonzentrierter Schwefelsäure besprüht und 20 Minuten lang auf 130° erhitzt. Es zeigte sich, daß in den geprüften Fraktionen neben der Verbindung β_2 ein hoher Anteil zweier lipophilerer Substanzen mit den Rf-Werten: 0,44 und 0,53 enthalten war.

c) Versuche zur Isolierung von β_2 aus den angereicherten Fraktionen mittels multiplikativer Verteilung

Etwa 130 mg des mit der Verbindung β_2 angereicherten Substanzgemisches B (siehe Seite 108) sollten mittels multiplikativer Verteilung aufgetrennt werden. Das Substanzgemisch hatte im System: Isooctan/Methylisobutylketon/Aethanol/Wasser = 35/17/40/100 (v/v) einen Verteilungskoeffizienten $K=1,25$. In der Mikroverteilungsbatterie nach Hecker wurde dieses Substanzgemisch einem 25-stufigen Grundprozeß einer Craig-Verteilung und anschließendem Nachfraktionieren mittels einphasiger Entnahme der Oberphase unterworfen. Den Elementen wurden ca 30 μ l zur dc-Prüfung entnommen; Adsorbens: Kieselgel G, Laufmittel: Chloroform/Aceton=8/2 (v/v), Sprühreagenz: R_1 , 10 Min. 120°. Die zu isolierende Substanz β_2 war in den Fraktionen 1 bis 8 nachweisbar. Aus dem Verdampfungsrückstand dieser Fraktionen konnte β_2 jedoch mit den üblichen Lösungsmitteln nicht zur Kristallisation gebracht werden.

4) Multiplikative Verteilung des Unverseifbaren

1,3 kg getrocknete Früchte von *Serenoa repens* wurden erschöpfend mit Petroläther (40-80° siedend) vorextrahiert. Anschließende Extraktion mit Methylenchlorid im Umlaufverfahren lieferte nach dem Abdampfen des Lösungsmittels 30,0 g Methylenchloridextrakt. Dieser Extrakt wurde mit 100ml 20 %iger aethanolischer Kalilauge verseift. Die Gesamtmenge des Unverseifbaren wurde in Diäthyläther aufgenommen, die Ätherlösung über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Man erhielt 340 mg Unverseifbares. Dieser unverseifbare Anteil hatte im Lösungsmittelsystem: Hexan/Essigester/Aethanol/Wasser = 8/2/7/3 (v/v) einen Verteilungskoeffizienten $K=1$. Das Substanzgemisch wurde in der Verteilungsbatterie nach Hecker (10 ml Ober-, 10 ml Unterphase) einem 25-stufigen Grundprozeß einer Craig-Verteilung unterworfen. Nach abge-

geschlossenem Verteilungsprozeß wurden den einzelnen Elementen je 30 μ l zur dc-Prüfung entnommen (Adsorbens: Kieselgel G; Laufmittel: Chloroform/Aceton=7/3 (v/v); Sprühreagenz: R_1 , 10 Min. 120°). In den Elementen 1 bis 5 (70 mg Verdampfungsrückstand = C) war die Substanz B_2 dünnschichtchromatographisch nachzuweisen.

5) Praeparative Papierchromatographie B_2 -angereicherter Fraktionen

70 mg Substanzgemisch C wurden nach der papierchromatographischen Prüfung (siehe Tabelle 12) unter gleichen Bedingungen praeparativ aufgetrennt (70 mg in 5 ml Chloroform gelöst).

Substanz	Rf-Wert	Fluoreszenz im UV:245nm vor Behandlg. mit R_2	Fluoreszenz im UV:350nm nach Behandlg. mit R_2	Färbung am Tageslicht nach Be- handlg. mit R_2
I	0,06	fahl blau	fahl blau	-
II= R_2	0,20	dunkelblau	blau	rötlich
III	0,28	hellblau	fahl blau	-
IV	0,84	hellblau	fahl blau	-
V	0,93	fahl blau	fahl blau	-

Tabelle 12: Papierchromatographische Prüfung des B_2 -angereicherten Substanzgemisches C
Papier: mit einer Lösung von Formamid in Aceton (1/1=v/v) imprägniert
Laufmittel: Benzol/Methylenchlorid/Formamid= 40/10/2 (v/v); Oberphase
Laufzeit: 90 Minuten
Sprühreagenz: R_2 ; 10 Minuten 110°
Prüflösung: etwa 10 μ l der Stammlösung C

Substanz	Rf-Wert	Färbung am Tageslicht	Fluoreszenz im UV-Licht bei 350 nm
	0,70	gelblich	fahl graublau
	0,30	farblos	hellblau
B ₂	0,23	rotviolett	gelbrötlich

Tabelle 13: Papierchromatographische Prüfung des B₂-angereicherten Substanzgemisches C
 Papier: mit einer Lösung von Formamid in Aceton (1/1=v/v) imprägniert
 Laufmittel: Benzol/Methylenchlorid/Formamid= 40/10/2 (v/v);
 Oberphase
 Laufzeit: 90 Minuten; Prüflösung: 10 µl Lsg. C
 Sprühreagenz: 10 %ige aethanolische Lösung von Phosphorwolframsäure (g/v), 10 Min. 110°
 Färbungen und Fluoreszenzen: nach der Behandlung mit dem Sprühreagenz

Zur praeparativen Papierchromatographie wurden jeweils auf 18 Chromatogrammbögen (19x17 cm) 7 bis 9 Startpunkte zu je etwa 30 µl Stammlösung C aufgetragen. Die Chromatogramme wurden nach dem Entwickeln so lange im Trockenschrank auf 115° erhitzt, bis sich keine Nebel mehr bildeten. Die Zonen im Chromatogramm, die B₂ enthielten, wurden aus den Bögen getrennt und mit Aethanol und Chloroform am Rückfluß erhitzt. Die Lösungen wurden i. Vak. eingeengt. Der Verdampfungsrückstand des B₂-haltigen Eluats wurde an Papier rechromatographiert. So erhielt man eine Fraktion mit B₂, die mit geringen Mengen zweier lipophilerer Substanzen verunreinigt war (siehe dc-Prüfung an Kieselgel).

Tabelle 14: dc-Prüfung einer B₂-Fraktion, die nach praeparativer Papierchromatographie eines B₂-angereicherten Gemisches erhalten wurde
 Sprühreagenz: R₁; 10 Minuten 120°
 Prüflösung: 10 µl einer 0,1%igen Lösung der B₂-Fraktion in Chloroform
 Laufmittel: Chloroform/Aceton = 7/3 (v/v)

Substanz	Rf-Wert	Färbung am Tageslicht nach Behandlung mit R ₁	Fluoreszenz im UV-Licht bei 350 nm
I = B ₂	0,57	gelbbrot	gelb
II	0,66	farblos	fahl blau
III	0,80	farblos	fahl blau

Das Eluat der B₂-haltigen Fraktion der praeparativen papierchromatographischen Auftrennung wurde i.Vak. zur Trockne gebracht und lieferte etwa 8 mg gelbbraun gefärbten lackartigen Verdampfungsrückstand, der aus verschiedenen Lösungsmitteln nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte.

E) Auftrennung des unverseifbaren Anteiles aus dem Methanolextrakt

1) Isolierung des Unverseifbaren

100,0 g Epi- und Mesocarp der Früchte von Serenoa repens, die mit Petrolaether und Methylenchlorid vor-extrahiert waren, wurden am Soxhlet erschöpfend mit Methanol extrahiert (20 Stunden lang). Das Lösungsmittel wurde i.Vak. abdestilliert und der Extrakt (ca 16,0 g) hernach durch 1 1/2-stündiges Kochen mit 100 ml 20 %iger aethanolischer Kalilauge auf dem Wasserbade verseift. Die Gesamtmenge des Unverseifbaren wurde in Aether aufgenommen, die Aetherlösung über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. 100,0 g Droge lieferten ca 320 mg unverseifbaren Anteil des Methanolextraktes.

(2) Dünnschichtchromatographie des Unverseifbaren

Substanz	Rf-Wert	Färbung am Tageslicht nach Behandlung	Fluoreszenz im UV-Licht bei 350 nm mit dem Sprühreag.
γ_1	0,99	braunrot	farblos
γ_2	0,81	rötlich	ziegelrot
γ_3	0,72	farblos	fahl blaugrau
γ_4	0,60	gelblich	gelbgrün
γ_5	0,53	schwach rötlich	grünlich
γ_6	0,44	gelblich	gelbgrün
γ_7	0,33	farblos	grüngrau
γ_8	0,22	gelblich	grüngrau
γ_9	0,15	farblos	blaugrau
γ_{10}	0,08	farblos	blaugrau
B ₄	0,03	rötlich	ziegelrot
B-Sitosterin	0,81	rötlich	ziegelrot

Tabelle 15: Dünnschichtchromatographische Auftrennung
des Unverseifbaren aus dem Methanolextrakt
Adsorbens: Kieselgel G
Laufmittel: Chloroform/Aceton= 7/3 (v/v)
Sprühreagenz: R₁; 10 Min. 120°
Prüflösung: 30 µl einer 3,2 %igen Lösung
(g/v) des Unverseifbaren in
Aether

3) Säulenchromatographie des Unverseifbaren

a) Grobfraktionieren an Kieselgel

Der aus 440,0 g Droge erhaltene Methanolauszug (Droge mit Petrolaether und Methylenchlorid vorextrahiert) wurde vom Lösungsmittel befreit und lieferte 70,0 g Rückstand. Dieser Rückstand wurde mehrmals mit Chloroform in Portionen zu 50 ml ausgeschüttelt, bis der Chloroformauszug farblos war. Die vereinigten Chloroformphasen wurden auf wenige ml eingeeengt. Diese konzentrierte Lösung wurde auf eine Säule (3,5 cm Ø; 70,0 g Kieselgel 0,05-0,20 mm Ø; in Chloroform suspendiert; = Säule I) aufgetragen und die Säule mit Chloroform entwickelt und eluiert. Eine breite gelbe Zone lief vor, es folgte eine schmale braunrote Zone, an der Startfläche blieb eine braune Zone hängen. Nach längerer Elution mit Chloroform löste sich aus der braunroten eine gelborangefarbene Zone ab. Bei nachfolgender Elution mit Chloroform-Aether-Mischungen und Aether lösten sich aus der braungelben oberen Zone eine breite gelbe und folgend je eine schmale grünliche und gelbe Zone ab. Das Eluat wurde fraktioniert (siehe Tabelle) und an Kieselgel dc-geprüft. Diese Prüfung zeigte, daß die Trennung ausnahmslos Mischfraktionen mit mehreren im Chromatogramm deutlich voneinander getrennten Flecken geliefert hatte, zahlreiche Fraktionen schwänzten im Chromatogramm stark.

Tabelle 16: dc-Prüfung der Fraktionen des Eluats der Säulentrennung I

Adsorbens: Kieselgel G

Laufmittel: Chloroform/Aceton=8/2 (v/v)

Sprühreagenz: R₁, 10 Min. 120°

Prüflösung: jeweils etwa 40 µl Eluat

(Farben: b=blau; f=farblos; fg=fahl grünlich; fh=fahl hellblau; fr=fahl rötlich; gb=grünblau; gg=gelbgrün; grb=graublau; lb=leicht beige; lg=leicht gelblich; lzt= leuchtend ziegelrot; rrv=rosarot-violett; sr= schwach rötlich)

Elutions- mittel (Vol.%)	Frak- tion	Eluat in ml	Farbe des Eluats	Färbung am Tageslicht nach Behandlung mit dem Sprühreagenz	Fluores- zenz im UV bei 350 nm	Rf-Wert
CHCl ₃	1	100	farb- los	-	-	-
	2	50	gelb	rrv f	lzt grb	0,85 0,80
	3	50	hell- gelb	sr f	sr fh	0,85 0,80
	4	25	hell- gelb	f	fh	0,80
	5	25	gelb- orange	f f	fh grb	0,80 0,74
CHCl ₃ + 50% Aether	6	100	fahl- gelb	f f	fh grb	0,80 0,74
	7	50	gelb- lich	f f f f	grb gbr gbr gbr	0,80 0,74 0,71 0,65
	8	25	gelb- grün	rrv lb lb lb	lzt fh fh fh	0,86 0,74 0,71 0,65 schwänzt
	9	50	gelb	f fr fr f	fg grb fr fh	0,71 0,65 0,58 0,49 schwänzt
	10	30	gelb	f fr f f lg f	fh fh fr fh gg fh	0,61 0,53 0,46 0,40 0,30 0,25
Aether	11	200	gelb- braun	f lg	fh gg	0,59 schwänzt
Aether + 50% Essig- ester	12	100	hell gelb- braun	f f f lg	fr fh fr gg	0,35 0,30 0,25 0,15

Elutions- mittel (Vol.%)	Frak- tion	Eluat in ml	Farbe des Eluats	Färbung am Tageslicht nach Behandlung mit dem Sprühreagenz	Fluores- zenz im UV bei 350 nm	Rf-Wert
Essig- ester	13	100	hell gelb- braun	rrv	lzt	0,09 schwänzt
Essig- ester + 50% Aceton	14	100	hell gelb- braun	lg f f rrv	fg fh fh lzt	0,63 0,30 0,21 0,09 schwänzt
Aceton	15	200	farb- los	lg f f rrv	fg fh b lzt	0,63 0,30 0,21 0,09 schwänzt
	16	200	farb- los	lg •	gb	schwänzt

b) Versuch zur Isolierung von γ_6

Der im Vakuum zur Trockne gebrachte Rückstand der Fraktionen 10 und 11 der Trennung I des Unverseifbaren an Kieselgel wurde in 10 ml Chloroform gelöst und an einer Kieselgelsäule (II; 20,0 g Kieselgel 0,05 - 0,20 mm Ø; in Chloroform suspendiert) mit Chloroform, Chloroform-Aether-Mischungen, Aether, Essigester, Essigester und Aceton chromatographiert. Das Eluat wurde in sechs Fraktionen zu je 50 ml aufgefangen. Je 20 µl wurden den Fraktionen zur dc-Prüfung an Kieselgel entnommen (Laufmittel: Chloroform/Aceton=8/2 (v/v); Sprühreagenz: R₁, 10 Min. 120°). Die Trennung lieferte ausnahmslos Mischfraktionen, die Verbindung γ_6 war im Chloroform-eluat enthalten, konnte jedoch nicht zur Kristallisation gebracht werden.

c) Versuch zur Isolierung von γ_8

Der Trockenrückstand der 12. Fraktion der Trennung I wurde in 10 ml Chloroform gelöst, die Lösung auf eine Kieselgelsäule (III; 10,0 g Kieselgel 0,05-0,20 mm ϕ ; in Chloroform suspendiert; Säule 1,5 cm ϕ) aufgetragen. Die Säule wurde mit Chloroform entwickelt und eluiert (Fraktionen 1 bis 3), dann wurde mit Chloroform-Aether-Mischungen (Fraktion 4), Aether (Fraktion 5), Essigester (Fraktion 6) und Aceton (Fraktion 7) eluiert. Den Fraktionen wurden je 20 μ l zur dc-Prüfung an Kieselgel entnommen; Laufmittel: Chloroform/Aceton=8/2 (v/v); R_1 als Sprühreagenz. Das Aethereluat enthielt unter den genannten Bedingungen chromatographisch reines γ_8 . Die Verbindung konnte aus den üblichen Lösungsmitteln jedoch nicht zur Kristallisation gebracht werden.

4) Multiplikative Verteilung des Unverseifbaren

a) Erste multiplikative Verteilung des Unverseifbaren

Der Verteilungskoeffizient für das Unverseifbare aus dem Methanolextrakt wurde im Lösungsmittelsystem: Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/Aethanol/Wasser=95/5/75/25 bestimmt, er betrug $K=1$. Ein solches Lösungsmittelsystem schien für eine multiplikative Verteilung geeignet.

2,0 g unverseifbarer Anteil des Methanolextraktes wurden in der Verteilungsbatterie nach Hecker (50 ml Ober-, 50 ml Unterphase) einem 22-stufigen Grundprozeß einer Craig-Verteilung und anschließendem Nachfraktionieren mit einphasiger Entnahme der Unterphase unterworfen. Der Inhalt der Elemente wurde an Kieselgel dc-geprüft (Bedingungen unverändert) und nach der Übereinstimmung der chromatographischen Bilder im Vakuum zur Trockne eingeeengt; die entnommenen Unterphasen wurden ebenso behandelt.

Entnommene Unterphasen (3)	Rf-Wert	Farbe am Tageslicht nach Behandlung	Fluoreszenz im UV-Licht bei 350 nm mit dem Sprühreagenz
1 -6	0,93 0,82 0,75 0,68 0,60 schwärzt	rötlichblau hellbraunrot rosarotviolett farblos farblos	fahl rot rötlich leuchtend ziegelrot fahl blau fahl blau
7-12	0,96 0,90 0,84 0,79 0,72 0,53 schwänzt Start- punkt	braunrot bräunlich blaugrau hell gelbbraun farblos gelblich rosarotviolett	dunkel dunkel fahl blau graublau fahl grau gelbgrün leuchtend ziegelrot
13-18	0,72 0,72 0,53 0,47 0,40 Start- punkt	hell gelbbraun farblos gelblich beige beige rosarotviolett	hell graublau hell graublau gelbgrün fahl blaugrau fahl blaugrau leuchtend ziegelrot
19-22	0,79 0,72 0,53 0,47 0,40 0,33 Start- punkt	hell gelbbraun fast farblos, leicht beige gelblich hellgelblich hellgelblich hellgelblich rosarotviolett	hell graublau blau gelbgrün fahl graublau fahl graublau fahl graublau leuchtend ziegelrot
Lösungen in den Elemen- ten			
I-VI	0,72 0,53 0,49 0,37 0,28 0,20 Start- punkt	farblos gelblich leicht blaugrau gelblich farblos farblos schwach rosarotviolett	blau gelbgrün fahl blau gelbgrün hellblau blau schwach ziegelrot

Lösungen in den Elemen- ten	Rf-Wert	Farbe am Tageslicht nach Behandlg.	Fluoreszenz im UV-Licht bei 350 nm mit dem Sprühreagenz
VII-XII	0,72 0,53 0,49 0,37 0,28 0,20 Start- punkt	farblos gelblich leicht blaugrau intensiv gelb farblos farblos schwach rosarotviolett	blau gelbgrün fahl blau gelbgrün hellblau blau schwach ziegelrot
XIII-XXII	0,37 0,20 Start- punkt	schwach gelb farblos schwach rosarotviolett	leicht gelbgrün blau schwach ziegelrot
β -Sitosterin	0,75	rosarotviolett	leuchtend ziegelrot

Tabelle 17: dc-Prüfung der Lösungen aus den Elementen und der isolierten Unterphasen (3) der Craig-Verteilung des Unverseifbaren aus dem Methanolextrakt
 Adsorbens: Kieselgel G
 Laufmittel: Chloroform/Aceton=8/2 (v/v)
 Sprühreagenz: R_1 , 10 Min. 120°
 Prüflösung: 50 μ l den Fraktionen entnommen

b) Multiplikative Verteilung eines Gemisches mit den Verbindungen γ_8 und β_4

Der Verteilungskoeffizient für den festen Anteil der Gesamtfaktionen VII bis XXII wurde im Lösungsmittelsystem Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff/Aethanol/Wasser = 2,5/7,5/5,5/4,5 (v/v) bestimmt, er betrug $K = 0,6$. Der Verdampfungsrückstand dieser Fraktionen wurde nunmehr in der Verteilungsbatterie nach Hecker mit 23 Elementen, einem Volumenverhältnis der Unterphase zur Oberphase von 50:30 einem Grundprozeß einer einfachen Craig-Verteilung unterworfen. Den Elementen wurden jeweils 50 μ l Lösung zur dc-Prüfung an Kieselgel entnommen. Die chromatographisch

einheitlichen Lösungen wurden zusammen i. Vak. zur Trockne gebracht.

Fraktionen	Rf-Wert	Färbung am Tageslicht nach Behandlung mit dem Sprühreagenz	Fluoreszenz im UV-Licht bei 350 nm
1 - 3	0,60 0,47	farblos farblos	fahl blau fahl blau
4 - 12	0,60 0,47 0,30 0,05	farblos farblos gelblich farblos	fahl blau fahl blau gelbgrün rötlich
13 - 22	0,40 0,25 0,15 0,05	farblos farblos farblos rosarotviolett	fahl blaugrau blau fahl blaugrau leuchtend ziegelrot
B-Sito-sterin	0,61	rosarotviolett	leuchtend ziegelrot

Tabelle 18: dc-Prüfung der Fraktionen der multiplikativen Verteilung eines Substanzgemisches mit γ_8 und B_4
 Adsorbens: Kieselgel G
 Laufmittel: Chloroform/Aceton=8/2 (v/v)
 Sprühreagenz: R_1 ; 10 Min. 120°

Aus der aethanolischen Lösung des Rückstandes der Fraktionen 13 bis 22 erhielt man nach Zusatz von wenig Chloroform nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur ein mikrokristallines Produkt, das am besten aus Amylalkohol umzukristallisieren war. Diese mit B_4 bezeichnete Verbindung hatte einen Schmelzbereich von 291-296°. Der Trockenrückstand der Lösungen aus den Elementen 1 bis 12 konnte aus verschiedenen Lösungsmitteln nicht zur Kristallisation gebracht werden.

5) Isolierung der Verbindung β_4

a) Multiplikative Verteilung des Unverseifbaren und β_4 -angereicherter Fraktionen

Etwa 3,5 kg getrocknete Früchte, die mit Petroläther und Methylenchlorid vorextrahiert waren, lieferten nach der Extraktion mit Methanol und Abdampfen des Lösungsmittels 600,0 g zähflüssigen Methanolextrakt. Dieser Extrakt wurde in Portionen zu 100,0 g mit aethanolischer Kalilauge verseift, das Unverseifbare wurde mit Äther ausgeschüttelt (analog der Isolierung des Unverseifbaren; siehe Seite 112). Man erhielt insgesamt 13,0 g unverseifbaren Anteil, der auf dem Wasserbade auf 70° erwärmt und mit 5 Portionen zu je 100 ml Essigester bei 70° durchgerührt. Die vereinigten Essigesterauszüge lieferten nach dem Einengen i.Vak. 10,80 g Rückstand.

Zur ersten groben Auftrennung des essigesterlöslichen Anteiles in Portionen von etwa 2,70 g reichte ein 19-stufiger Grundprozeß einer einfachen Craig-Verteilung in der Verteilungsbatterie nach Hecker (50 ml Ober-, 50 ml Unterphase) im System: Tetrachlorkohlenstoff/Äthanol/Wasser=10/8/2 (v/v) aus. In diesem System hatte der Essigesterextrakt einen Verteilungskoeffizienten $K=0,5$.

Die dc-Prüfung der Phasen der Elemente der ersten multiplikativen Verteilung, zu der den Elementen jeweils 50 μ l Lösung entnommen wurden, zeigte, daß β_4 in den Elementen 5 bis 12 angereichert enthalten war. Diese Lösungen wurden vereinigt und i.Vak. eingeeengt. Sie lieferten 2,58 g Verdampfungsrückstand, der im System Hexan/Essigester/Äthanol/Wasser =4/6/5/5 (v/v), in dem er einen Verteilungskoeffizienten von $K=0,42$ hatte, einem 19-stufigen Grundprozeß einer Craig-Verteilung unterworfen (50 ml Ober-, 50 ml Unterphase) wurde. Danach war die Verbindung β_4 in den Elementen 13 bis 19 dünn-schichtchromatographisch gut nachweisbar.

Aus den vereinigten Lösungen der Elemente 13 bis 19 der vorangegangenen multiplikativen Verteilung wurde das Lösungsmittel i.Vak. abdestilliert, man erhielt 2,2 g Rückstand. Dieser Rückstand wurde nunmehr im System Essigester/Cyclohexan/Aethanol/Wasser = 3/7/7/3 (v/v) einem 19-stufigen Grundprozeß einer Craig-Verteilung (50 ml Ober-, 50 ml Unterphase) unterworfen. Aus den gesammelten Lösungen der Elemente 5 bis 8 wurde das Lösungsmittel i.Vak. abdestilliert, der Rückstand in Aethanol/Chloroform (80/20) gelöst. Der nach 24 stündigem Stehen aufgetretene mikrokristalline Niederschlag wurde abgetrennt und zuerst aus Amylalkohol, dann aus viel Aethanol/Chloroform (8/2) umkristallisiert. Man erhielt 165 mg der in Form farbloser winziger Täfelchen kristallisierenden Verbindung B_4 mit dem Fp: 292-293°.

b) Charakterisierung von B_4 durch analytische Methoden

a) Löslichkeit

Die Verbindung B_4 ist sehr schwer löslich in Benzol, Cyclohexan, Petroläther und Aceton, schwer löslich in Chloroform, Aethanol und Methanol, löslich in Amylalkohol und gut löslich in Pyridin.

B) Schmelzpunkt

Die aus viel Aethanol unter Zusatz von Chloroform dreimal umkristallisierte und danach in Form winziger farbloser Täfelchen oder Prismen erhaltene Verbindung B_4 hatte den Fp: 292-293°.

γ) Elementaranalyse

Die Substanz wurde vor der Analyse im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

Gefunden:	C	71,84%	H	10,32%
Berechnet für $C_{35}H_{60}O_6$ (576,48)	C	72,87%	H	10,48%

δ) IR-Absorptionsspektrum

Die Absorptionsbanden liegen bei folgenden Wellenzahlen:

$\gamma_{\max}(\text{cm}^{-1}) = 3378\text{s}, 2924\text{s}, 2890\text{s}, 1458\text{m}, 1439\text{w}, 1379\text{m},$
 $1364\text{m}, 1250\text{w}, 1195\text{w}, 1168\text{m}, 1130\text{m}, 1106\text{m}, 1066\text{s},$
 $1021\text{s}, 962\text{w}, 952\text{w}, 926\text{w}, 885\text{w}, 840\text{w}, 800\text{w},$
 $797\text{w};$

(s = starke, m = mittelstarke, w = schwache
Bande)

c = 1,09 mg / 200 mg KBr

ε) Acetylierung von B₄

50 mg B₄ wurden in 5 ml Pyridin geköst und unter Eiskühlung mit 5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Die Lösung wurde 24 Stunden lang bei 18° aufbewahrt. Danach wurde das eisgekühlte Reaktionsprodukt unter kräftigem Umrühren in 20 ml eisgekühltes Wasser gegossen. Der entstandene Niederschlag wurde abgetrennt, mit Eiswasser nachgewaschen, im Exsikkator getrocknet und dreimal aus Aethanol umkristallisiert. Man erhielt farblose Täfelchen mit dem Fp: 168,5 - 170°.

ξ) Säurehydrolytische Spaltung von B₄

10 mg der einmal aus Aethanol/Chloroform umkristallisierten Verbindung B₄ (Fp: 291-296°) wurden mit 3 ml 25 %iger Salzsäure, 3 ml Amylalkohol und 3 ml Aethanol 30 Minuten lang am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Beim Abkühlen des Reaktionsproduktes fiel das Aglykon aus, es wurde abfiltriert.

§₁) Chromatographischer Nachweis des Zuckers

Das Filtrat wurde mit einigen Tropfen Di-n-Octylamin neutralisiert (Reaktion gegen Universalindikatorpapier Merck). Dabei fiel ein voluminöser Niederschlag aus, der abfiltriert und zweimal mit je 3 ml Wasser nachgewaschen wurde. Das Filtrat und die Waschwässer wurden vereinigt und zur Entfernung des überschüssigen Di-n-Octylamins dreimal mit je 2 ml Essigester ausgeschüttelt. Der Ausschüttelungsrückstand wurde dann im Vakuum auf ca 2 ml eingeeengt, 2 ml Methanol wurden hinzugefügt, die Lösung auf ein Filterblättchen von 3 cm Ø im Warmluftstrom (Föhn) aufgetragen. Dieses Filterpapier wurde dreimal mit je 1 ml kaltem Wasser eluiert. Die

wässrige Lösung wurde zum pc-Nachweis des Zuckeranteiles des Glykosides B_4 gebraucht.

Papier: 19 x 19 cm; Prüflösung: je ca 0,3 ml der Zuckerlösung wurden aufgetragen; die Chromatogramme wurden in drei Laufmittelsystemen entwickelt (siehe Tabelle)

Monosaccharid	Rf-Werte im System		
	I	II	III
Xylose	0,53	0,36	0,22
Glukose	0,44	0,28	0,15
B_4 -Zucker	0,44	0,28	0,15
Rhamnose	0,57	0,50	0,45
Mannose	0,45	0,34	0,23

Tabelle 19: Papierchromatographischer Vergleich des Zuckers B_4Z mit einigen authentischen Monosacchariden

Sprühreagenz: Anilinphthalatlösung
10 Min. 105°

Laufmittel:

I) n-Butanol/Pyridin/Wasser = 6/4/3

II) n-Butanol/Aethanol/Wasser/28%Ammoniak = 10/3/5/0,25

III) n-Butanol/Essigsäure/Wasser = 4/1/5

§2) Charakterisierung des Aglykons B_4A

6 mg Niederschlag, der bei der säurehydrolytischen Spaltung von 10 mg Glykosid B_4 (Fp:291-296°) angefallen war wurden in 5 ml einer Mischung gleicher Volumenteile Benzol und Chloroform gelöst und an einer Kieselgelsäule (2 cm Ø; 10,0 g Kieselgel 0,05-0,20 mm Ø; in Chloroform/Benzol=1/1 (v/v)) mit Chloroform/Benzol = 1/1 (v/v) chromatographiert. Die Säule wurde mit der Benzol-Chloroformmischung entwickelt und eluiert: Fraktionen 1 bis 9, dann wurde mit Chloroform: Fraktion 10, Chloroform-Aceton-Mischungen: Fraktionen 11 bis 13, Aceton: Fraktion 14 und Aethanol: Fraktion 15 eluiert. Das Eluat wurde bei

einer Durchtropfgeschwindigkeit von etwa 20 Tropfen pro Minute in Fraktionen zu 12 ml (Fraktionen 1 bis 10) und 25 ml (Fraktionen 11 bis 15) getrennt aufgefangen. Einzig aus den Fraktionen 9 bis 12 konnten wägbare Mengen Aglykon in einer Ausbeute von 3,5 mg chromatographisch rein erhalten werden. Dieses Aglykon wurde als B₄A bezeichnet. Die einzelnen Fraktionen wurden bei 70° Wasserbadtemperatur i.Vak. auf ca 1ml eingeengt. 5 bis 8 ul dieser Lösungen wurden zur dc-Prüfung an Kieselgel entnommen.

Frak- Substanz tion		Rf-Wert	Färbung am Tageslicht	Fluoreszenz im UV-Licht 350 nm
1 - 2		0,97 0,25	bräunlich farblos	unspezifisch dunkel schwach blau
3		0,97 0,95 0,25	bräunlich blaugrau farblos	unspezifisch dunkel rötlich schwach blau
5 - 8		-	-	-
9 - 12	B ₄ A	0,21	rosarot- violett	ziegelrot
14	B ₄	Start- punkt	rosarot- violett	ziegelrot

Tabelle 20: dc-Prüfung der Fraktionen der chromatographischen Auftrennung des Aglykon B₄A
Rf-Wert, Färbung und Fluoreszenz der beobachteten Flecke nach Behandlung mit dem Sprühreagenz R₁
Laufmittel: Benzol/Chloroform = 1/1 (v/v)

F) Analytische und mikropraeparative Auftrennung des unverseifbaren Anteiles aus der Urtinktur

a) Digitoninfällung

Aus 100,0 g Sabal-Urtinktur erhielt man nach dem Einengen i.Vak. 5,50 g Rückstand, der durch einstündi-

ges Kochen mit 100 ml 20 %iger aethanolischer Kalilauge auf dem Wasserbade verseift wurde. Die Gesamtmenge des Unverseifbaren wurde in Aether aufgenommen. Die Aetherlösung wurde nach der Trocknung über Natriumsulfat i.Vak. eingeeengt. Die Lösung des Rückstandes in 10 ml Aethanol wurde zum Sieden erhitzt und mit 10 ml einer siedend heißen 1%igen aethanolischen Digitoninlösung versetzt. Anschließend wurde tropfenweise destilliertes Wasser hinzugefügt bis eine deutliche Fällung eintrat, das Reaktionsgemisch wurde eine halbe Stunde lang unbedeckt auf ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach dem Erkalten des Reaktionsgemisches wurde die Fällung abzentrifugiert.

Dieses Fällungsprodukt wurde im Exsikkator getrocknet, dann in 2 ml Pyridin gelöst und durch Zusatz von 75 ml Aether das Digitonin ausgefällt. Anschließend wurde abzentrifugiert und die überstehende Lösung i.Vak. eingeeengt. Der Verdampfungsrückstand wurde in 6 ml Aethanol gelöst (Lösung a). Je 30 µl der Lösung a und des Zentrifugates des Digitoninfällung (Lösung b) wurden zur dc-Prüfung genommen (siehe Tabelle).

Probe- lösung	Rf-Wert	Färbung am Tageslicht	Fluoreszenz im UV-Licht (350 nm)
a	0,92 0,85 schwänzt	rötlich rosarotviolett	fahl rötlich leuchtend ziegelrot
b	0,98 0,94 0,57 0,08 schwänzt	bräunlich blaugrau leicht gelbrot rosarotviolett	unspezifisch dunkelbraun fahl rötlich leicht gelblich leuchtend ziegelrot
B-Sito- sterin	0,85	rosarotviolett	ziegelrot

Tabelle 21: dc-Prüfung des Digitoninfällungsproduktes und des Zentrifugates der Digitoninfällung aus der Sabal-Urtinktur
Adsorbens: KieselgelG; Laufmittel:
Chloroform/Aceton=7/3 (v/v)

Rf-Wert, Färbung und Fluoreszenz der
im Chromatogramm nach Behandlung mit
dem Sprühreagenz R₁ (10 Min. 120°)
beobachteten Flecke

b) Auftrennung des Filtrates der Digitoninfällung

Die 460 mg Verdampfungsrückstand des Filtrates der
Digitoninfällung wurden in einem 25-stufigen Grundprozeß
einer Craig-Verteilung in der Verteilungsbatterie nach
Hecker (10ml Ober-, 10 ml Unterphase) im Lösungsmittel-
system: Aethanol/Wasser/Hexan/Essigester=8/2/7/3 (v/v)
unterworfen. In diesem Lösungsmittelsystem hatte das
Substanzgemisch einen Verteilungskoeffizienten K=1.
Je 30 µl wurden den Elementen entnommen und dc-geprüft.

Frak- tion	Rf-Wert	Färbung am Tageslicht	Fluoreszenz im UV-Licht bei 350 nm
1-5	0,57 0,08 schwänzt	gelbrot rosarotviolett	hellgelb leuchtend ziegelrot
6-10	0,08 schwänzt	rosarotviolett	ziegelrot
11-15	0,08 schwänzt	rosarotviolett	ziegelrot
16-20	0,92 0,85 schwänzt	rötlich rosarotviolett	fahl rötlich ziegelrot
21-25	0,92 0,85 schwänzt	rötlich rosarotviolett	fahl rötlich ziegelrot

Tabelle 22: dc-Prüfung der Fraktionen der multipli-
kativen Verteilung des Filtrates der
Digitoninfällung an Kieselgel
Rf-Wert, Farbe und Fluoreszenz der im
Chromatogramm nach Behandlung mit dem
Sprühreagenz R₁ beobachteten Flecke
Laufmittel: Chloroform/Aceton= 7/3 (v/v)

Der Verdampfungsrückstand der Gesamtfractionen 1 bis 5 (mit β_2) wurde praeparativ an formamidimprägniertem Papier aufgetrennt. Die Zone mit β_2 wurde aus

Papier: 19 x 17 cm, formamidimprägniert

Laufmittel: Benzol/Methylenchlorid/Formamid=40/10/2

(v/v) Oberphase

Sprühreagenz: R_2 ; 10 Min. 110°

aus den Bögen getrennt. β_2 wurde mit heißem Chloroform eluiert, konnte jedoch nicht zur Kristallisation gebracht werden.

G) Quantitative Bestimmung von Sitosterin in den getrockneten Früchten von *Serenoa repens*

a) Bestimmung des nicht glykosidisch gebundenen Sitosterins

Proben zu je 50,0 g Droge wurden nacheinander am Soxhlet erschöpfend mit Petrolaether ($40-60^\circ$ siedend) und Methanol extrahiert. Die Auszüge wurden vereinigt und i.Vak. bis fast zur Trockne eingeeengt. Man erhielt dabei etwa 24,8 g Rückstand. Dieser Rückstand wurde durch einstündiges Kochen mit 20 ml Natriummethylatlösung (durch Auflösen von 1,5 g Natrium in 20 ml Methanol p.a. frisch bereitet = Nmlsg.) auf dem Wasserbade verseift. Anschließend wurden 50 ml Wasser hinzugefügt und die Gesamtmenge des Unverseifbaren durch Ausschütteln in Diaethylaether aufgenommen. Die vereinigten Aetherlösungen wurden dreimal mit je 10 ml Wasser nachgewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i.Vak. eingeeengt; der Verdampfungsrückstand wurde in 10 ml siedendem Aethanol gelöst und mit 5 ml einer siedend heißen 1 %igen aethanolischen Digitoninlösung versetzt. Dann wurde Wasser bis zum Eintritt einer deutlichen Fällung hinzugefügt. Das Gemisch wurde auf dem Wasserbade auf ein Drittel des Volumens eingeeengt, nach dem Erkalten dreimal mit je 5 ml Chloroform durchgeschüttelt. Dabei färbte sich die Chloroformphase intensiv gelbrot und der Niederschlag wurde annähernd farblos. Die Chloroformphase wurde abgetrennt und verworfen. Die überwiegend wässrige Phase

mit dem Niederschlag wurde nun wieder mit 5 ml Aethanol versetzt, kurz zum Sieden erhitzt und nach dem Erkalten zentrifugiert. Der Niederschlag wurde abgetrennt, getrocknet, dann in 3 ml Pyridin gelöst und aus der Pyridinlösung wurde durch Zusatz von etwa 80 ml Aether das Digitonin ausgefällt. Das Gemisch wurde zentrifugiert, die überstehende Pyridin-Aether-Lösung i. Vak. eingeeengt und der Rückstand im Exsikkator nachgetrocknet. Der Trockenrückstand wurde ausgewogen. Auf diese Weise wurden vier Bestimmungen durchgeführt, die Auswagen betrugen: 1) 9,25 mg; 2) 9,60 mg; 3) 9,30 mg; 4) 9,55 mg. Daraus ergibt sich ein mittlerer Sitosteringehalt (frei oder möglicherweise esterartig gebunden) in den getrockneten Früchten von $18,9 \pm 0,4$ mg % (bezogen auf getrocknete Früchte).

b) Bestimmung des Gesamtsitosterins

Zur quantitativen Bestimmung des Gesamtsitosterins in den getrockneten Früchten wurden wiederum Proben zu je 50,0 g Droge nacheinander mit Petrolaether (40-60° siedend) und Methanol erschöpfend am Soxhlet extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit 50 ml 38 %iger Salzsäure, 25 ml Aethanol und 25 ml Amylalkohol 1 Stunde lang auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde im Vakuum auf 50 ml eingeeengt, nach dem Erkalten mit 50 ml Wasser versetzt und erschöpfend mit Aether extrahiert. Die vereinigten Aetherlösungen wurden zweimal mit je 10 ml 10 %iger wässriger Kalilauge durchgeschüttelt, anschließend mit Portionen zu etwa 10 ml Wasser bis zur neutralen Reaktion gegen Universalindikatorpapier (Merck) gewaschen. Die Aetherlösung wurde über Natriumsulfat getrocknet, anschließend im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde durch einstündiges Kochen mit 20 ml Natriummethylatlösung (Nmlsg.) verseift. Die Verseifungslauge wurde mit etwa 50 ml Wasser versetzt und nach dem Erkalten erschöpfend mit Aether extrahiert. Die vereinigten Aetherlösungen wurden dreimal mit je 10 ml

gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingeengt. Der Rückstand wurde in 10 ml siedendem Aethanol gelöst und mit 5ml einer siedend heißen 1 %igen aethanolischen Digitoninlösung versetzt. Bis zum Eintritt einer deutlichen Fällung wurde Wasser hinzugefügt und weiter aufgearbeitet, wie es zur Bestimmung des nicht glykosidisch gebundenen Sitosterins beschrieben wurde. Es wurden sechs Bestimmungen durchgeführt, die Auswagen betrugen: 1) 22,1 mg; 2) 21,4 mg; 3) 20,0 mg; 4) 21,95 mg; 5) 19,1 mg; 6) 19,6 mg. Daraus läßt sich ein mittlerer Gesamtsitosteringehalt (freies, möglicherweise esterartig gebundenes und glykosidisch gebundenes Sitosterin) in den getrockneten Früchten von $41,6 \pm 2,8$ mg % errechnen.

H) Quantitative Bestimmung von Sitosterin in der Urtinktur
a) Bestimmung des nicht glykosidisch gebundenen
Sitosterins

Proben zu je 50,0 g Urtinktur wurden im Vakuum eingeengt und lieferten in der Regel etwa 6,2 g Verdampfungsrückstand. Dieser Rückstand wurde mit 10 ml Natriummethylatlösung (Nmlsg.) eine Stunde lang auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Die weitere Aufarbeitung geschah analog der Bestimmung des nicht glykosidisch gebundenen Sitosterins in den Extrakten aus den getrockneten Früchten, abweichend wurde das Unverseifbare zur Digitoninfällung nur in 5 ml siedendem Aethanol gelöst und das Fällungsprodukt wurde nur mit drei Portionen zu 3 ml Chloroform durchgeschüttelt. Es wurden sieben Bestimmungen durchgeführt, die Auswagen betrugen: 1) 6,1 mg; 2) 6,45 mg; 3) 6,55 mg; 4) 6,0 mg; 5) 6,7 mg; 6) 6,35 mg; 7) 6,3 mg. Daraus ergibt sich ein mittlerer Sitosteringehalt von $12,7 \pm 0,7$ mg %, bezogen auf 100,0 g Urtinktur *Sabal serrulatum*.

b) Bestimmung des Gesamtsitosterins

Zur Bestimmung des Gesamtsitosterins gingen wir wiederum von Proben zu 50,0 g Urtinktur aus. Die Urtinktur wurde eingeengt, der Rückstand mit 25 ml 38 %iger Salzsäure, 15 ml Amylalkohol und 15 ml Aethanol eine Stunde lang zum Sieden erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde im Vakuum auf etwa 25 ml eingeengt, nach dem Erkalten mit 50 ml Wasser versetzt und weiter aufgearbeitet, wie es zur Bestimmung des Gesamtsitosterins in den Extrakten aus den getrockneten Früchten beschrieben wurde. Abweichend wurden die vereinigten sauren Aetherauszüge nur mit Portionen zu 5 ml Kalilauge und 5 ml Wasser behandelt, zur Fällung wurde das Unverseifbare in 5 ml siedendem Aethanol gelöst und das Fällungsprodukt wurde mit drei Portionen zu je etwa 3 ml Chloroform durchgeschüttelt. Es wurden fünf Bestimmungen durchgeführt. Die Auswagen betrugen: 1) 13,05 mg; 2) 9,0 mg; 3) 8,15 mg; 4) 14,0 mg; 5) 11,1 mg. Daraus läßt sich ein mittlerer Gesamtsitosteringehalt in der Urtinktur von $22,3 \pm 6$ mg % errechnen.

V) Literaturverzeichnis

- 1) WEISS, R.F.: Lehrbuch der Phytotherapie,
Stuttgart 1960, p. 285-286
- 2) SCHINDLER, H.: Inhaltsstoffe und Prüfungsmethoden
homöopathisch verwendeter Heilpflanzen,
Aulendorf i. Württ. 1955, p.171-172,223
- 3) SCHOELER, H.: Kompendium der wissenschaftlichen
und praktischen Homöopathie, Leipzig
1940, p. 106
- 4) HOPPE, H.A.: Drogenkunde, Hamburg 1958, p. 803
- 5) BAILEY, L.H.: " Revision of the Palmettoes" in
Gentes Herbarum, Vol.VI, Fasc. VII,
Ithaca New York 1944, p. 366-459
- 6) ENGLER, A., PRANTL, K.: Die natürlichen Pflanzen-
familien, Teil II, Leipzig 1889,
- 7) BAILEY, L.H.: Gentes Herbarum, Vol. III, Fasc.VI,
Ithaca New York 1934, a) p.278, b) p.283,
c) p. 294, d) p. 288
- 8) BERGER, F.: Handbuch der Drogenkunde, Band 3,
Wien 1952, p. 421-422
- 9) CURRACH, J.C.: Palms of the World, New York 1960
- 10) TOMLINSON, P.B.: Anatomy of the Monocotyledons,
II. Palmae, Oxford 1961,
- 11) ENGLER, A.: Syllabus der Pflanzenfamilien, Band II,
Berlin 1964, p. 579 ff.
- 12) KRAEMER, H.: A textbook of botany and pharmacognosy,
Philadelphia und London 1910, p. 578
- 13) GRIEBEL, C., BARNES, E.: Ztschr. Unters. Nahrungs-
u. Genußmittel, 31, 282 (1916)
- 14) SCHWENKER, G., KLOSS, P.: Privatmitteilung, Arbeit
im Druck
- 15) SHERMAN, P.L., BRIGGS, C.H.: Pharm. Archives, 2,
101 (1899), zit. nach 2)
- 16) SCHREINER, O.: Pharm. Review, 18, 220 (1900),
zit. nach 2)

- 17) MANN, : Bull. Univ. Wisconsin Nr. 767 (Schimmel,
Ber. 1916, 42) zit. nach 2)
- 18) Homöopathisches Arzneibuch, p. 13, 427,
Verlag W. Schwabe, Berlin 1953
- 19) SHINODA, J.: J. Pharm. Soc. Japan, 48, 214 (1928)
zit. nach 166)
- 20) GRIEBEL, C.: Apothekerzeitung, 31, 306, (1916)
zit. nach 2)
- 21) WEHMER, C.: Die Pflanzenstoffe, Band I, Jena 1929,
p. 117-118
- 22) SHERARD, : Proc. amer. pharm. Assoc. 42, 312 (1894)
zit. nach 21)
- 23) READ, J.B.: Amer. J. Pharm. 51, 169 (1879), zit.
nach 24)
- 24) HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Band II,
Basel 1963, p. 408
- 25) LOEWE, S., LANGE, F., SPOHR, E.: Biochem. Z. 180,
1-26 (1927), zit. nach 18)
- 26) DOHRN, M., FAURE, W., POLL, H., BLOTEVOGEL, W.:
Med. Klin. 22, 1417-1419 (1926), zit. nach
18)
- 27) FELLNER, O.O.: Med. Klin. 22, 1886-1888 (1926),
zit. nach 18)
- 28) SCHAUER, H.: Dtsche Apothekerzeitung, Nr. 29, 987 ff.
(1964)
- 29) DOISY, E.A., VELER, C.D., THAYER, S.: Amer. J. Physiol.
90, 329 (1929), zit. nach 35)
- 30) DOISY, E.A.: J. Biol. Chem. 86, 499 (1930) zit.
nach 35)
- 31) DOISY, E.A.: J. Biol. Chem. 87, 357 (1930), zit.
nach 35)
- 32) MARRIAN, G.F.: Biochem. J. 23, 1090 (1929), zit.
nach 35)
- 33) BUTENANDT, A.: Naturwissenschaften, 17, 879 (1929),
zit. nach 35)
- 34) BUTENANDT, A.: Z. physiol. Chem. 191, 127 (1930)

- 35) KARRE, W.: Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Basel 1958, p.844-845
- 36) LOEWE, S.: ref. Chem. Zentralbl. 1926, II, 2608
- 37) BUTENANDT, A., JACOBI, H.: Z. physiol. Chem. 218, 104 (1933)
- 38) SKARZYNSKI, B.: Nature, 131, 766 (1933a)
- 39) SKARZYNSKI, B.: Bull. intern. acad. polon. classe sci. math. nat. B II, 347 -353 (1933 b) zit. nach 18)
- 40) SCHOELLER, W., DOHRN, M., HOHLWEG, W.: Naturwissenschaften, 28, 532-533 (1940)
- 41) CAIN, J.C.: Nature (London), 188, 774 (1960) zit. nach 28)
- 42) BRADBURY, R.B., WHITE, D.E.: Vitamins Horm. 12, 207 (1954)
- 43) POPE, G.S., ELCOATE, P.V., SIMPSON, S.A., ANDREWS, D.G.; Chemistry & Industry, p. 1092 (1953)
- 44) HÖRHAMMER, L., WAGNER, H., GRASSMAIER, H.: Naturwissenschaften, 45, 388 (1958)
- 45) GUGGOLZ, J., LIVINGSTON, A.L., BICKOFF, E.M.: J. Agric. & Food Chemistry, 9, 330 (1961), zit. nach 28)
- 46) BRADBURY, R.B., WHITE, D.E.: J. Chem. Soc. p.871-876 (1953), zit. nach 42)
- 47) BICKOFF, E.M., BOOTH, A.N., LYMAN, R.L., LIVINGSTON, A.L., THOMPSON, C.R., KOHLER, G.O.: J. Agric. & Food Chemistry, 6, 536 (1958), zit. nach 28)
- 48) BRIESKORN, C.H., HOFMANN, H.: Archiv der Pharmazie, 297, 577-588 (1964)
- 49) KNÖRR, K., LEHR, H., PROBST, V.: Die Medizinische, 195 (1956), zit. nach 28)
- 50) FIESER, L.F., CAMPBELL, W.P.: J. Amer. Chem. Soc. 61, 2528-2534 (1939), zit. nach 42)
- 51) BRANDT, C.W., ROSS, C.J.: Nature 161, 892 (1948), zit. nach 42)
- 52) ZEISS, H.H., SLIMOWICZ, C.E., PASTERNAK, V.Z.: J. Amer. Chem. Soc., 70, 1981-1982 (1948)

- 53) BAIZER, M.M., KARNOWSKY, M., BYWATER, W.G.:
J. Amer. Chem. Soc., 72, 3800-3801 (1950)
- 54) HASSAN, A., ELGHAMRY, M.J., ZAYED, S.M.A.D.: Die
Naturwissenschaften, 17, 409 (1964)
- 55) ELGHAMRY, M.J.: Zeitschr. für Naturforschung,
Heft 7, 206, 686 - 688 (1965)
- 56) EL-RIDI, M.S., EL MOFTY, A., KHALIFA, K., SOLIMAN,
Lucy: Zeitschr. für Naturforschung, 15b,
Heft 1, 45-49 (1960)
- 57) BELAK, S., SZATHMARY, J.: Biochem. Z. 291, 260-262,
(1937)
- 58) ZSELOKA, L., ILLENYI, A.: Biochem. Z., 291, 263-265
(1937)
- 59) KEMPER, F., LOESER, A.: Arzneimittelforschung, 7,
81 (1957)
- 60) KOELLER, R.: Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haus-
tierbesamung 5, 45 (1955)
- 61) KOELLER, R.: Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haus-
tierbesamung 5, 32 (1955)
- 62) ZALKOW, L.H., BURKE, N.J., KEEN, G.: Tetrahedron
Letters, 4, 217 (1964)
- 63) GRUNDON, M.F., KING, F.E.; Nature 54 (1949)
- 64) ERDTMANN, H.; Naturwissenschaften 27, 130 (1939)
- 65) JENCKEL, L., DÖRNENBURG, E. in MÜLLER, E.: Methoden
der organischen Chemie (HOUBEN-WEYL) Teil 1,
Band III, Phasikalische Methoden, Stuttgart
1955, p. 720-749
- 66) BLOCH, K.: Angew. Chemie 77, Nr. 21, 944-954 (1965)
- 67) OTTKE, R.C., TATUM, E.L., ZABIN, I., BLOCH, K.:
J. biol. Chemistry, 189, 429 (1951)
- 68) ARIGONI, D.: In: Ciba Foundation Symposium on the
Biosynthesis of Terpenes and Sterols,
p. 231 (1959), zit. nach 70)
- 69) ARIGONI, D.: Experimentia 14, 153 (1958), zit. nach
70)
- 70) WILLUHN, G.: Pharmazeut. Ztg. Nr.3, 96-106 (1965)
- 71) NICHOLAS, H.J.: J. Pharm. Sci., 50, 623 (1961)
zit. nach 70)

- 72) NICHOLAS, H.J.: J. Biol. Chem., 237, 1481 (1962)
- 73) BONNER, J., ARREGUIN, B.: Arch. Biochem. Biophysics, 21, 109 (1949), zit. nach 66)
- 74) VISHNIAC, H.S.; Biochem. Biophys. Acta, 26, 430 (1957), zit. nach 70)
- 75) JOHNSON, D.F., BENNETT, R.D., HEFTMANN, E.: Science, 140, 198 (1963), zit. nach 70)
- 76) WRIGHT, L.D., CRESSON, E.L., SKEGGS, H.R., MAC RAE, G.D.E., HOFFMANN, C.H., WOLF, D.E., FOLKERS, K.: J. Amer. Chem. Soc. 78, 5273 (1956), zit. nach 66)
- 77) TAVORMINA, P.A., GIBBS, M.H., HUFF, J.W.: J. Amer. Chem. Soc. 78, 4498 (1956), zit. nach 66)
- 78) RUDNEY, H.; J. biol. Chemistry, 227, 363 (1957), zit. nach 66)
- 79) LYNEN, F., HENNING, K., BUBLITZ, C., SORBO, B., KROEPHIN-RUEFF, L., Biochem. Z., 330, 269 (1958), zit. nach 66)
- 80) KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Stuttgart 1964, p. 208-210
- 81) FERGUSON, J.J. jr., DURR, J.F., RUDNEY, H.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 45, 499 (1959), zit. nach)
- 82) KNAPPE, J., RINGELMANN, E., LYNEN, F.: Biochem. Z., 332, 195 (1959)
- 83) BUCHER, N.L., OVERATH, P., LYNEN, F.: Biochem. Biophys. Acta, 40, 491 (1960)
- 84) ANEDERSON, G.D., NORGARD, D.W., PORTER, J.W.: Arch. Biochem. Biophysics. 88, 68 (1960)
- 85) RILLING, H., TCHEN, T.T., BLOCH, K.: Proc. nat. Acad. Sci. USA, 44, 167 (1958), zit. n. 66)
- 86) LINDBERG, M., YUAN, C., DE WAARD, A., BLOCH, K.: Biochemistry, 1, 182 (1962), zit. nach 66)
- 87) AGRANOFF, B.W., EGGERER, H., HENNING, K., LYNEN, F.: J. Amer. chem. Soc., 81, 1254 (1959)
- 88) POPJAK, G., CORNFORTH, J.W., CORNFORTH, R.H., RYHAGE, R., GOODMAN, O.S.: J. Biol. Chem., 237, 56 (1962), zit. nach 121)

- 89) LYNEN, F., AGRANOFF, B.W., EGGERER, H., HENNING, K., MÖSLEIN, E.M.: Angew. Chem. 71, 657 (1959)
- 90) POPJAK, G., LOWE, A.E., MOORE, O., BROWN, L., SMITH, F.A.: J. Lipid. Res. 1, 29 (1959), zit. nach 66)
- 91) KANDUTSCH, A.A., PAULUS, H., LEVIN, E., BLOCH, K.: J. biol. Chemistry, 239, 2507 (1964), zit. nach 66)
- 92) POPJAK, G.: Proceedings of the Vith International Congress of Biochemistry; New York 1964, Bd. VII, p.545, zit. nach 66)
- 93) POPJAK, G., DE WITT.S., GOODMAN, J.W., Cornforth, R.H., Ryhage, R.: J. biol. Chemistry, 236, 1934 (1961), zit. nach 66)
- 94) JENNY, E.F., DRUEY, J.: Angew. Chem. 74, Nr. 4, 152-153 (1962)
- 95) LANGDON, R.G., BLOCH, K.: J. biol. Chemistry, 200, 129 (1952)
- 96) NICHOLAS, H.J.: J. biol. Chemistry, 237, 1485 (1962), zit. nach 70)
- 97) MAUGDAL, R.K., TCHEN, T.T., BLOCH, K.: J. Amer. chem. Soc. 80, 2589 (1958), zit. nach 66)
- 98) VOSER, W., MIJOVIC, M.W., HEUSSER, H., JEGER, O., RUZICKA, L.: Helv. chim. Acta 35, 2414 (1952), zit. nach 66)
- 99) WOODWARD, R.B., BLOCH, K.; J. Amer. chem. Soc. 75, 2023, (1953), zit. nach 66)
- 100) BLOCH, K.: Helv. chim. Acta 36, 1611 (1953), zit. nach 66)
- 101) RUZICKA, L.: Experimentia, 9, 357 (1953), zit. nach 121)
- 102) SMALL, J.K.: Manual of the Southeastern Flora, University of North Carolina Press 1933 p. 242
- 103) INGOLD, H.: Structure and mechanism in organic Chemistry, p. 519 ff. (London)

- 104) ROBERTS, J.D., LEE, C.C.: J. Amer. Chem. Soc., 73, 5009 (1951), zit. nach 119)
- 105) RICHARDS, J.H., HENDRICKSON, J.B.: The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins, New York 1964, p. 275-276
- 106) SCHWENK, E., ALEXANDER, G.J.: Arch. Biochem. Biophys. 76, 63 (1958), zit. nach 70)
- 107) GONZALEZ, G.A., HORA, M.L.G.: Chem. Abstr., 48, 10041 (1954)
- 108) DJERASSI, C., MILLIS, J.S., VILLOTTI, R.: J. Amer. Chem. Soc., 80, 1005 (1958)
- 109) DJERASSI, C., KRAKOWER, A.J., LEMIN, A.J., LIU, L.H., MILLS, J.S., VILLOTTI, R.: J. Amer. Chem. Soc., 80, 6284, (1958)
- 110) COX, J.S.G., KING, F.E., KING, T.J.: J. Chem. Soc. 514 (1959), zit. nach 70)
- 111) ELGHAMRY, M.J., ZAYED, S.M.A.D.: Planta Medica, 14, 217-221 (1966)
- 112) DJERASSI, C., KNIGHT, J.C., WILKINSON, D.J.: J. Amer. Chem. Soc., 85, 835 (1963)
- 113) HEUSNER, A.: in: W. RUHLAND, Handbuch der Pflanzenphysiologie, Band X, Berlin 1958, p.132-185
- 114) DANIELSON, H., BLOCH, K.: J. Amer. Chem. Soc., 79, 500 (1957)
- 115) ALEXANDER, G.J., SCHWENK, E.: J. biol. Chem., 232, 611 (1958), zit. nach 70)
- 116) PARKS, L.W.: J. Amer. Chem. Soc., 80, 2023 (1958), zit. nach 70)
- 117) FISCHER, F.G., MÄGERLEIN, H.: Ann. Chem., 636, 88 (1960), zit. nach 70)
- 118) ZALKOW, L.H., BURKE, N.J., KEEN, G.: Tetrahedron Letters, 4, 217 (1964)
- 119) RUZICKA, L.: in: A. TODD, Perspectives in Organic Chemistry, New York 1956, p. 265-314
- 120) HÜCKEL, W.: Theoretische Grundlagen der organischen Chemie, Band I, p. 409 ff., Leipzig 1957
- 121) BERNDT, J.: Pharmazeut.Ztg. Nr. 50, 1752-1758 (1965)

- 122) BENECKE, G.M.R.: J. Liebigs Annalen der Chemie, 122, 249 (1862), zit. nach 124)
- 123) HESSE, O.: J. Liebigs Annalen der Chemie, 192, 175 (1878), zit. nach 124)
- 124) HEUSNER, A.: in: W. RUHLAND, Handbuch der Pflanzenphysiologie, Band X, Berlin 1958, 132-177
- 125) WOODWARD, R.B., DONDHEIMER, F., TAUB, D., HEUSLER, K., MC LAMORE, W.M.: J. of the Amer. Chem. Soc. 73, 2403, 3547, 3548; (1951)
- 126) KIPNIS, F.: Science (Lancaster, Pa.) 118, 754 (1953)
- 127) JANTZEN, E., GOHDES, W.: Biochem. Z. 272, 167 (1934)
- 128) POWER, F.B., SALWAY, A.H.: J. of the Chem. Soc. (London) 103, 399-406 (1913)
- 129) MITSUHASHI, H., SHIMIZU, Y.: Chem. Pharm. Bull. Japan, 8, 313-317 (1960) Nr. 4
- 130) WHITBY, G.S., DOLID, J., YORSTON, F.H.: J. Chem. Soc., 1448 (1926)
- 131) BERGMANN, W.: in D.I. ARNON, Annual Review of Plant Physiology, Vol. 4, 413 (1953)
- 132) SALWAY, A.H.: J. Chem. Soc., 1022 (1913), zit. nach 131)
- 133) KING, F.E., BOTTOMLEY, W.: J. Chem. Soc. (London), 1399-1403 (1954)
- 134) WHITBY, G.S.: Biochem. J., 17, 5 (1923), zit. nach 131)
- 135) WALLIS, E.S., FERNHOLZ, E.: J. Amer. Chem. Soc., 58, 2446 (1936)
- 136) GLOYER, ST.W., SCHUETTE, H.A.: J. Amer. Chem. Soc., 61, 1901 (1939), zit. nach 131)
- 137) BERNSTEIN, S., WALLIS, E.S.: J. Amer. Chem. Soc. 61, 2308 (1939)
- 138) BERNSTEIN, S., WALLIS, E.S.: J. Org. Chem. 2, 341 (1937), zit. nach 131)
- 139) DIRSCHERL, W., NAHM, H.: J. Liebigs Annalen der Chemie, 555, 57 (1943)
- 140) MANCERA, O., ROSENKRANZ, G., SONDHEIMER, F.: Naturwissenschaften, 43, 17 (1956)

- 141) ICHIBA, A.: ref.: Chem. Zbl. 1936, I, 1027
- 142) SIMPSON, J.G.E., WILLIAMS, N.E.: J. Chem. Soc. (London), 733 (1937)
- 143) NEUDERT, W., RÖPKE, H.: Steroid-Spektrenatlas, Berlin 1965
- 144) HADORN, H., JUNGKUNZ, R.: Mitt. Lebensmittelunters. Hyg., 42, 452 (1951)
- 145) NEHER, R., Steroid Chromatographie, Amsterdam 1964, p. 58
- 146) NEU, R.: Privatmitteilung
- 147) OLLIS, W.D.: in GEISSMAN, T.A.: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Oxford 1962,
- 148) HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 2, Basel 1963, p. 392 ff.
- 149) ROBINSON, G.M., ROBINSON, R.: Biochem. J., 27, 207 (1933)
- 150) TRIMBLE, H.: J. Pharm., 68, 397 (1896), zit. nach 148)
- 151) BATE-SMITH, E.C., SWAIN, T.: Chem. & Ind. (London), 377 (1953)
- 152) ROSENHEIM, O.: Biochem. J., 14, 178-188 (1920);
- 153) PHIPERS, R.F.: Biochem. J. 29, 1376 (1935)
- 154) KING, F.E., CLARK-LEWIS, J.W.: Chem. & Ind. 757-758 (1964)
- 155) MA, R.M., SCHAFFER, P.S.: Arch. Biochem. Biophys. Vol. 47, Nr.2, 419-423 (1953)
- 156) HECKER, E.: Verteilungsverfahren im Laboratorium, Weinheim/Bergstr. 1955
- 157) KOFLER, L., WANNENMACHER, R.: in: KOFLER, L. und A.: Thermo-Mikromethoden, Innsbruck 1954, p. 317
- 158) STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie ein Laboratoriums-handbuch, Springer, Berlin 1962
- 159) MICHALEC, C.: Biochim. Biophys. Acta, 19, 189 (1956)
- 160) HEER, J., MIESCHER, K.: Helv. chim. Acta 28, 156 (1945), zit. nach BÜCHI, J.: Grundlagen der Arzneimittelforschung und der synthe-

tischen Arzneimittel, Basel 1963

- 161) SCHNEIDER, M.: Einführung in die Physiologie des Menschen, Berlin 1955, p.294-341
- 162) Index Merck, Darmstadt 1961, p. 688
- 163) BÜCHI, J.: Grundlagen der Arzneimittelforschung und der synthetischen Arzneimittel, Basel 1963
- 164) KAUFMANN, H.P.: Analyse der Fette und Fettprodukte einschließlich der Wachse, Harze und verwandter Stoffe, Band I, Berlin 1958
- 165) LANDOIS-ROSEMAN, A.: Physiologie des Menschen, Berlin 1955
- 166) VENKATARAMAN, K.: in GEISSMAN, T.A.: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Oxford 1962, p.104

VI) Lebenslauf

Am 2. September 1939 wurde ich, Gisela Irmgard Schöpflin, als Tochter des Kurt Schöpflin (techn. Redakteur) und seiner Ehefrau Emilie, geb. Burster, in Berlin geboren.

Vom September 1945 bis Juli 1953 besuchte ich die 30. Grundschule in Berlin-Karlshorst und danach bis zum Juli 1957 die Kant-Oberschule in Berlin-Lichtenberg (Abitur im Mai 1957).

Im September 1957 siedelte ich mit meiner Mutter und den Geschwistern zum Vater nach Hannover über. Im Winterhalbjahr 1957/58 nahm ich am Vorbereitungskursus zur Anerkennungsprüfung des Reifezeugnisses in Delmenhorst-Adelheide teil (Anerkennungsprüfung im März 1958).

In der Zeit vom April 1958 bis März 1960 absolvierte ich in der Klagesmarkt-Apotheke, Hannover die Praktikantenzeit (pharmazeutische Vorprüfung März 1960).

Zum Sommersemester 1960 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin. Vom 1. Juni 1961 bis 31. März 1963 war ich dort am Pharmazeutischen Institut als studentische Hilfskraft tätig. Nach 6-semesterigem Studium bestand ich im Frühjahr 1963 die Pharmazeutische Prüfung.

Seit Juni 1963 beschäftigte ich mich mit der vorliegenden Arbeit unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. Hänsel am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität.

Vom 1. Juli 1964 bis 30. September 1965 war ich als wissenschaftliche Hilfsassistentin am gleichen Institut beschäftigt. Seit Oktober 1965 bin ich dort mit der Wahrnehmung der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten beauftragt.

Die Approbation als Apotheker erhielt ich im Juni 1964.

